

**Wirkungen von CO₂ auf die Temperaturtoleranz und
Fitnessindikatoren einer Crustaceenart
aus verschiedenen Klimazonen**

CO₂ effects on thermal tolerance and fitness indicators
of a crustacean in different climate zones

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
– Dr. rer. nat. –

dem Fachbereich 2 Biologie / Chemie
der Universität Bremen
vorgelegt von

Kathleen Walther
Diplom-Biologin

Bremen 2010

Gutachter:

1. **Gutachter: Prof. Dr. H. O. Pörtner**, Universität Bremen
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,
Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven

2. **Gutachter: Prof. Dr. W. Hagen**, Universität Bremen
FB II: Biologie/Chemie Universität NW II A,
Loebener Straße, 28359 Bremen

1. **Prüfer: Prof. Dr. K. Bischof**, Universität Bremen
FB II: Biologie/Chemie Universität NW II, A,
Loebener Straße, 28359 Bremen

2. **Prüfer: Dr. K. Anger**, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und
Meeresforschung, Biologische Anstalt Helgoland,
Ostkaje 1118, 27498 Helgoland

Tag des Promotionskolloquiums: 08.11.2010



Seespinne *Hyas araneus* (L.) (Foto: Jan N. Knott)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Klimawandel: Ozeanversauerung und -erwärmung..... | 1 |
| 1.1.1 Ozeanversauerung..... | 1 |
| 1.1.2 Erwärmung..... | 2 |
| 1.1.3 Wahl des geeignete Modellorganismus..... | 4 |
| 1.2 Temperaturtoleranz..... | 5 |
| 1.3 Modellorganismus - <i>Hyas araneus</i> (L.)..... | 7 |
| 1.3.1 Verbreitung..... | 7 |
| 1.3.2 Lebenszyklus von <i>Hyas araneus</i> der Helgolandpopulation..... | 9 |
| 1.4 Biochemische Zusammensetzung..... | 11 |
| 1.5 Kalzifizierung..... | 12 |
| 1.6 Das Enzym Natrium-Kalium ATPase (Na ⁺ /K ⁺ -ATPase)..... | 14 |
| 1.7 Fragestellungen..... | 15 |
| | |
| 2. Material und Methoden..... | 17 |
| 2.1 Modellorganismus <i>Hyas araneus</i> | 17 |
| 2.2 Versuche mit adulten <i>Hyas araneus</i> | 18 |
| 2.2.1 Messungen des Temperaturtoleranzfensters unter..... | 18 |
| verschiedenen CO ₂ -Bedingungen | |
| 2.2.2 Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-Aktivitäts- und Expressionsmessung..... | 20 |
| 2.3 Versuche mit larvalen <i>Hyas araneus</i> | 21 |
| 2.3.1 Hälterung der Larven..... | 21 |
| 2.3.2 Biochemische Analysen..... | 22 |
| 2.3.3 Messung von Kalzium mit der Ionenchromatographie..... | 23 |
| 2.4 Statistische Analysen..... | 23 |
| | |
| 3. Publikationen..... | 25 |
| I: Impact of anthropogenic ocean acidification on thermal tolerance of..... | 27 |
| the spider crab <i>Hyas araneus</i> | |

| | |
|--|------------|
| II: Effects of ocean acidification and warming on the larval development of..... | 51 |
| the spider crab <i>Hyas araneus</i> from different latitudes (54° vs. 79°N) | |
| III: Impacts of ocean warming and acidification on larval calcification of..... | 85 |
| the spider crab <i>Hyas araneus</i> (L.) from different latitudes (54° vs 79°N) | |
| IV: Characterization of the Na ⁺ /K ⁺ -ATPase in gills of the spider crab..... | 117 |
| <i>Hyas araneus</i> (L.) from different latitudes (54° and 79°N) | |
| | |
| 4. Diskussion..... | 135 |
| 4.1 Temperaturtoleranz von adulten <i>Hyas araneus</i> im Klimawandel..... | 135 |
| 4.1.1 Temperaturtoleranzfenster..... | 135 |
| 4.1.1.1 Zukünftige Untersuchungen zur Temperaturtoleranz..... | 140 |
| von <i>Hyas araneus</i> | |
| 4.1.2 Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-Aktivität und –Expression..... | 140 |
| 4.1.2.1 Zukünftige Untersuchungen zur Na ⁺ /K ⁺ -ATPase..... | 142 |
| 4.2 Temperaturtoleranz von larvalen <i>Hyas araneus</i> im Klimawandel..... | 143 |
| 4.2.1 Entwicklung und Fitness der Larven..... | 143 |
| 4.2.1.1 Entwicklung der Zoea-Stadien..... | 143 |
| 4.2.1.2 Entwicklung des Megalopa-Stadiums..... | 145 |
| 4.2.1.3 Wachstum und biochemische Zusammensetzung..... | 147 |
| 4.2.1.3.1 Trockengewicht und Kohlenstoffgehalt..... | 147 |
| 4.2.1.3.2 Trockengewicht und Kohlenstoff-zu-Stickstoff..... | 151 |
| -Verhältnis | |
| 4.2.1.4 Zukünftige Untersuchungen zur Larvalentwicklung..... | 157 |
| von <i>Hyas araneus</i> | |
| 4.2.2 Grenzen der Temperaturtoleranz von <i>Hyas araneus</i> -Larven..... | 158 |
| 4.2.3 Kalzifizierung von <i>Hyas araneus</i> -Larven..... | 161 |
| 4.2.3.1 Zukünftige Untersuchungen zur Kalzifizierung..... | 165 |
| 4.3 Ausblick..... | 165 |
| | |
| 5. Literaturverzeichnis..... | 171 |

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|--------------------------------------|
| C | Kohlenstoff |
| Ca^{2+} | Kalzium-Ion |
| Ca^{2+} -ATPase | Kalzium ATPase |
| CaCO_3 | Kalziumkarbonat |
| $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauscher | Kalzium-Protonen Austauscher |
| C/N-Verhältnis | Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis |
| CO_2 | Kohlendioxid |
| CO_3^{2-} | Karbonat-Ion |
| H^+ | Protonen |
| HCO_3^- | Bikarbonat-Ion |
| H_2CO_3 | Kohlensäure |
| $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ Austauscher | Bikarbonat-Chlorid Austauscher |
| M0 | Megalopa 0.Tag |
| M3 | Megalopa 3.Tag |
| M7 | Megalopa 7. Tag |
| M14 | Megalopa 14. Tag |
| $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher | Natrium-Kalzium Austauscher |
| Na^+/K^+ -ATPase | Natrium-Kalium ATPase |
| PCO_2 | CO_2 -Partialdruck |
| PeO_2 | Hämolymphe-Sauerstoffpartialdruck |
| ppm | parts per million |
| T_p | Pejus-Temperatur |
| T_c | kritische Temperatur |
| ZI | Zoea I |
| ZII | Zoea II |

Zusammenfassung

Die Verbrennung fossiler Brennstoffe und die fortschreitende anthropogene CO₂-Emission führen zunehmend zu einer Versauerung und Erwärmung der Ozeane. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen des Klimawandels auf die Temperaturtoleranz der Seespinne *Hyas araneus* (L.) untersucht, deren Verbreitungsgebiet im Nordostatlantik von der gemäßigten Zone bis in die Sub-Arktis reicht. Verglichen wurden die Populationen von Svalbard (79°N, Habitatterperatur 0 - 6 °C) und Helgoland (54°N, Habitatterperatur 3 - 18 °C), welche die nördliche und südliche Verbreitung der Art repräsentieren.

Durch Messungen der Herzrate und des Sauerstoffpartialdrucks in der Hämolymphe im Temperaturbereich von 0 bis 25 °C wurde das Temperaturtoleranzfenster der *H. araneus* von Helgoland (54°N) bestimmt. Dabei kam es durch eine Erhöhung der CO₂-Konzentration zu einer Verschiebung der oberen kritischen Temperatur hin zu niedrigeren Temperaturen. Bei einer CO₂-Konzentration von 710 ppm reduzierte sich die Grenze von über 25 °C auf 23.5 °C. Durch eine drastischere Erhöhung auf 3000 ppm CO₂ sank die obere kritische Temperatur auf bis zu 21.1 °C. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass bei synergistischen Wirkungen der Erwärmung (bis zu 22.5 °C) und erhöhte CO₂-Konzentrationen die Population von *H. araneus* bei Helgoland bereits in naher Zukunft an ihre physiologischen Grenzen stoßen könnte.

In weiteren Untersuchungen wurden die Auswirkungen des Klimawandels auf frühe und damit potentiell sensiblere Lebensstadien untersucht. Hierzu wurden Larven von *H. araneus* aus beiden Populationen verschiedenen Temperaturen und CO₂-Konzentrationen ausgesetzt. Die Larven zeigten in beiden Populationen eine temperaturabhängige Entwicklung, wobei die Helgolandlarven ein schnelleres Wachstum und größere Fitness aufwiesen als die Larven aus Svalbard. Eine erhöhte CO₂-Konzentration führte in allen Larvenstadien beider Populationen zu einer verzögerten Entwicklung. Dabei reagierte vor allem das Megalopa-Stadium der Helgolandpopulation sehr empfindlich gegenüber erhöhten CO₂-Konzentrationen, wohingegen Megalopen der Svalbardpopulation besonders sensitiv gegenüber einer Erwärmung waren. Die negativen Effekte der Klimafaktoren waren in diesem Stadium so drastisch, dass man bei den Megalopen von einem "bottleneck"-Stadium in der Entwicklung der Art sprechen kann.

Weiterhin wurden die Effekte des Klimawandels auf die Kalzifizierungskapazität der Larvenstadien von *H. araneus* untersucht. Durch erhöhte CO₂-Konzentrationen konnte eine populations- und temperaturabhängige Reduzierung des Kalziumgehaltes der Larven festgestellt werden. Bei den Helgolandlarven aller Temperaturen korrelierte eine Reduktion des Kalziumgehaltes positiv mit dem Gewicht. Dagegen kam es bei den Svalbardlarven bei kalten Temperaturen (3 °C) zu einer drastischen Reduzierung des Kalziumgehaltes bei gleich bleibendem Gewicht. Anders als die Helgolandlarven zeigten Arktische Larven bei warmen Temperaturen (15 °C) und 3000 ppm CO₂ dann jedoch eine verstärkte Kalzifizierung.

Untersuchungen der Aktivität und Expression des Enzyms Na⁺/K⁺-ATPase veranschaulichten weitere Unterschiede in der Temperaturanpassung der beiden *H. araneus* Populationen. Die Kiemen der Svalbardkrebse zeigten eine höhere *in vitro* Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität bei einer Erwärmung über ihren Habitattemperaturbereich hinaus als die Helgolandkrebse. Dies deutet auf eine hohe thermische Sensibilität der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität und ein engeres Temperaturfenster der Svalbardpopulation, im Vergleich zur Helgolandpopulation, hin.

Die Untersuchungen zu den Auswirkungen von erhöhten CO₂-Konzentrationen auf die Temperaturtoleranz und Fitnessindikatoren der Seespinne *Hyas araneus* belegten populationsspezifische unterschiedliche physiologische Anpassungen an ihre jeweiligen Habitattemperaturbereiche. Die synergistischen Effekte einer fortschreitenden Erwärmung und Ozeanversauerung wirken sich negativ auf die jeweilige Population durch unterschiedliche physiologische Einschränkungen innerhalb ihrer Lebensstadien aus. Darüber hinaus wird ein fortschreitender Klimawandel für die südliche Verbreitungsgrenze der Art (Helgoland) vermutlich zu einer Verschiebung in nördlichere Gebiete führen.

Summary

Anthropogenic CO₂ emissions threaten marine ecosystems by increasing water temperature and ocean acidification. In this study the impacts of climate change on the thermal tolerance of the spider crab *Hyas araneus* (L.) were investigated. Population comparisons were conducted on populations from Svalbard (79°N, habitat temperature 0 - 6 °C) and Helgoland (54°N, habitat temperature 3 - 18 °C), representing the species's northern and southern distribution range which is the temperate Northeast Atlantic to the Sub-Arctic region.

The thermal tolerance window of *H. araneus* from Helgoland (54°N) was determined by measurements of the heart rate and hemolymph oxygen partial pressure upon temperatures ranging from 0 to 25 °C. Elevated CO₂-concentrations induced a lowering of upper critical temperature from beyond 25 °C down to 23.5 °C (710 ppm). An increase of environmental CO₂ concentrations to 3000 ppm caused a concomitant drop of the upper critical temperature to 21.1 °C. These results indicate, that the *H. araneus* population from Helgoland will knock on its physiological borders by synergistic effects of warming (up to 22.5 °C) and elevated CO₂ concentrations.

Additionally, studies on the impacts of climate change on early, potentially more sensitive life stages were conducted. Larvae of *H. araneus* of both populations were exposed to different temperatures and CO₂ concentrations, revealing a temperature-dependent development. Larvae of Helgoland grew faster and had a higher fitness compared to those from Svalbard. Elevated CO₂ concentration caused a disturbed development in all stages of both populations. Helgoland megalopae displayed the highest sensitivity against enhanced CO₂ concentrations. In contrast, megalopae from Svalbard were more sensitive to warming. The negative effects of both, CO₂ and temperature lead to the conclusion that the megalopae is a putative bottleneck stage during the species development.

Moreover, the effect of climate change was investigated on the calcification capacity of the *H. araneus* larval stages. Elevated CO₂ concentrations entailed population and temperature dependent reductions of the calcium contents of the larvae. In Helgoland larvae, reduction of calcium contents correlated positively with their body weight. In contrast, Svalbard larvae revealed a dramatic drop in calcium contents, with body weight remaining constant at cold temperatures (3 °C). Different to the Helgoland

larvae, Svalbard larvae displayed increased calcification rates at warm temperatures (15 °C) under 3000 ppm CO₂ exposure.

Studies on Na⁺/K⁺-ATPase activity and expression identified additional differences in both *H. araneus* populations regarding thermal adaptation. Compared to Helgoland crabs, gill *in vitro* Na⁺/K⁺-ATPase activity of the Svalbard population showed a strong increment upon warming beyond their specific habitat temperature. This indicates a high thermal sensitivity of the Na⁺/K⁺-ATPase and a narrowed thermal window of the Svalbard population compared to the Helgoland population.

Studying the effect of elevated CO₂ concentrations on the thermal tolerance and fitness indicators of the spider crab *Hyas araneus* revealed different population specific physiological adaptations to their respective habitat temperatures. The synergistic effects of warming and ocean acidification will have negative effects on different processes of each population, related to various life stages due to physiological constraints. Furthermore, the progressing climate change will presumably lead to a northward shift of the southern (Helgoland) distribution range of the species.

1. Einleitung

Der Klimawandel hat seine Bedeutung in der Meeresumwelt sowohl in der Erhöhung der CO₂-Konzentration in der Atmosphäre und der Versauerung der Ozeane als auch in der Erwärmung, die sich global über alle Ökosysteme in unterschiedlichem Ausmaß erstreckt. In Hinblick auf diese Entwicklung soll die Wirkung der Ozeanversauerung und -erwärmung auf Crustaceen verschiedener Klimazonen (gemäßigte und Sub-Arktische) untersucht werden.

1.1 Klimawandel: Ozeanversauerung und -erwärmung

1.1.1 Ozeanversauerung

Kohlendioxid aus der Atmosphäre löst sich im Meerwasser und bildet, je nach pH-Wert, Kohlensäure (H₂CO₃), Bikarbonat (HCO₃⁻) und Karbonate (CO₃²⁻) unter Freiwerden von Protonen entsprechend folgender Formel:



Der pH-Wert des Meerwassers liegt im Bereich von pH 7.8 bis 8.4, so dass zu 90 % HCO₃⁻ vorliegt, gefolgt von CO₃²⁻ (ca. 10 %) und CO₂ (< 1 %) (Wolf-Gladrow et al. 1999, Körtzinger 2010). Dieses so genannte Karbonat-Puffer-System wird durch seine sich im Gleichgewicht befindlichen Substanzen gebildet. Die zunehmende Steigerung des anthropogenen CO₂-Ausstoßes, z.B. aus fossilen Brennstoffen oder Industrieabgasen, führt seit Beginn der industriellen Zeit zu einer fortschreitenden Anreicherung von CO₂ in der Atmosphäre (IPCC 2001, 2007). Das atmosphärische Kohlendioxid gelangt vermehrt ins Meerwasser und wird durch Wind- und Wellenbewegungen im Ozean verteilt (Sabine et al. 2004). Dadurch steigt der Kohlendioxidpartialdruck (PCO₂) im Meer und folgedessen auch die Protonenkonzentration, was zur Versauerung des Meerwassers führt, messbar durch eine Erniedrigung des pH-Wertes (IPCC 2001, 2007, Caldeira & Wickett 2003, 2005, Feely et al. 2004, Orr et al. 2005).

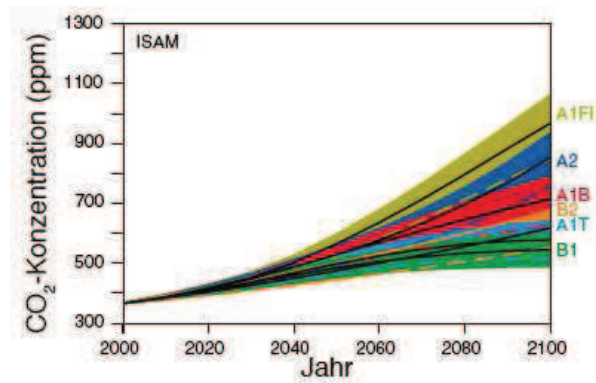


Abb. 1.1.1. Klimaszenarien für erwartete atmosphärische CO₂-Konzentration. Im Szenario A1B werden 710 ppm für das Jahr 2100 postuliert (IPCC 2001).

Modellrechnungen haben gezeigt, dass der zunehmende CO₂-Ausstoß zu einer weiteren Ozeanversauerung in den nächsten Jahrzehnten und Jahrhunderten führen wird. Caldeira & Wickett (2005) prognostizieren beispielsweise für das Jahr 2100 eine atmosphärische CO₂-Konzentration von 710 ppm (Abb. 1.1.1). Abhängig von der Menge genutzter fossiler Brennstoffe wird für das Jahr 2300 eine atmosphärische CO₂-Konzentration von 3000 ppm vorausgesagt (IPCC 2001; Abb. 1.1.2).

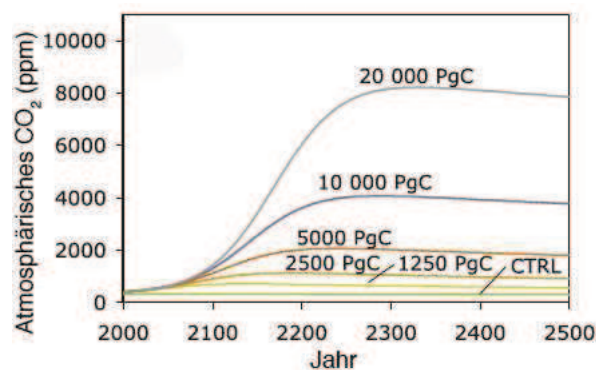


Abb. 1.1.2. Klimaszenarien nach Caldeira & Wickett (2005). Für das Jahr 2300 werden abhängig von der Kohlenstoffemission 3000 ppm CO₂ bei einer Verbrennung von 7500 Pg Kohlenstoff erwartet.

1.1.2 Erwärmung

Neben der Zunahme der Kohlendioxidkonzentration wurde in den letzten Jahrzehnten auch eine Erwärmung der Ozeane (Hegerl & Bindoff 2005), zum Beispiel in den gemäßigten Breiten und der Arktis (Overpeck et al. 1997, Johnnesen et al. 2004),

festgestellt. Unter anderem dokumentierten Wiltshire & Manly (2004) für die letzten 40 Jahre einen mittleren Temperaturanstieg an der Helgoländer Reede (Deutsche Bucht, Nordsee) von 1.1 °C (Abb. 1.1.3).

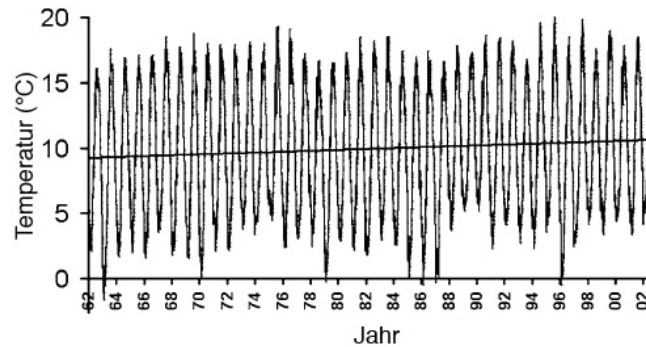


Abb. 1.1.3. Durchschnittliche Wassertemperatur der Helgoländer Reede von 1962 bis 2002 mit ersichtlicher Erwärmung um 1.1 °C (Wiltshire & Manly 2004).

Zukünftig wird sich die Lufttemperatur abhängig vom Szenario der CO₂-Emission weiter erwärmen (IPCC 2001), was auch eine weitere Ozeanerwärmung zur Folge haben wird. Je nach Szenario können bis zum Jahr 2100 mittlere Temperaturanstiege der Atmosphäre von 1.7 bis 2.5 °C global erreicht werden (IPCC 2001; Abb. 1.1.4). Die Wassertemperatur um Helgoland wird im Durchschnitt mit 3 bis 18 °C angegeben, wobei in den Sommermonaten auch bis zu 20 °C erreicht werden können (Wiltshire & Manly 2004). Ausgehend von einem Szenario von 710 ppm im Jahr 2100 kann sich das Meerwasser in der Region in den Sommermonaten auf bis 22.5 °C erwärmen.

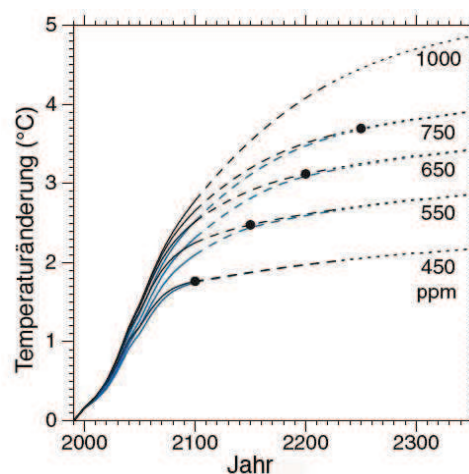


Abb. 1.1.4. Mittlere globale Temperaturänderung der Atmosphäre je Szenario (IPCC 2001).

1.1.3 Wahl des geeigneten Modellorganismus

Der erhöhte CO₂-Partialdruck (PCO₂) im Meerwasser beeinflusst marine Organismen beispielsweise durch die Verringerung der Kalziumkarbonat-Sättigung (CaCO₃) im Meer, was zu Störungen im Säure-Basen-Gleichgewicht führt (Pörtner et al. 2004, Fabry et al. 2008) und die Kalzifizierungsrate von Schalenbildnern beeinflusst (Pörtner et al. 2004, Fabry et al. 2008). In den letzten Jahren wurden vielfach die gravierenden Effekte der Ozeanversauerung auf marine Invertebraten untersucht (z.B. Berge et al. 2006, Metzger et al. 2007, Dupont et al. 2008, Kurihara 2008, Egilsdottir et al. 2009, Findlay et al. 2009). Zahlreiche Studien konnten z.B. eine Verzögerungen in der Embryonalentwicklung von Amphipoden (Egilsdottir et al. 2009), erhöhte Mortalitäten und morphologische Störungen von Seesternlarven (Dupont et al. 2008), eine Verringerung der Reproduktionsrate und eine gesteigerte Mortalität von Copepoden (Kurihara et al. 2004, Mayer et al. 2007) sowie Wachstumsstörungen bei Muscheln und Krebslarven (Berge et al. 2006, Kurihara et al. 2007, Arnold et al. 2009) aufzeigen. Zudem wurden Störungen des Säure-Basen-Gleichgewichtes (Michaelidis et al. 2005, Miles et al. 2007) und in der Kalzifizierung (Hoegh-Guldberg et al. 2007, Andersson et al. 2008, Arnold et al. 2009, Findlay et al. 2010) bei Muscheln und Krebsen festgestellt.

Dekapode Crustaceen stellen bei der Betrachtung der Effekte der Ozeanversauerung und -erwärmung auf die marine Tierwelt eine besonders bedeutende Gruppe dar. Sie weisen ein kalzifiziertes Exoskelett auf, dessen Zusammensetzung durch Änderungen im pH-Wert und Temperatur beeinflusst werden kann (Roca & Wansard 1997, Arnold et al. 2009, Clavier et al. 2009, Findlay et al. 2010). Auf der Suche nach einer für diese Arbeit als Modellorganismus geeignete Crustaceenart war, neben dem kalzifizierten Exoskelett, besonders die Verbreitung in verschiedenen Klimazonen entscheidend. Unterschiedliche Klimazonen bieten den Organismen unterschiedliche Habitattemperaturen, welche die jeweiligen Populationen in ihrer Temperaturtoleranz beeinflussen. Weiterhin ist zu beachten, dass der Eintrag von anthropogenem CO₂ aus der Atmosphäre ins Meer je nach Region und deren Temperatur stark schwanken kann. In den Polarregionen ist der CO₂-Eintrag in die Meere und somit die Versauerung stärker als in der gemäßigten Zone (Steinacher et al. 2009). Es besteht daher ein großes Interesse, die Auswirkungen der erhöhten CO₂-

Konzentrationen an Crustaceen aus den Arktischen oder Sub-Arktischen Regionen im Vergleich zu Crustaceen aus der gemäßigten Zone zu ermitteln.

Neben den Untersuchungen an adulten Crustaceen sollen mögliche Effekte des Klimawandels auf frühe Entwicklungsstadien analysiert werden, denn die Entwicklung eines Organismus in den ersten Larvenstadien gibt Rückschlüsse über die weitere Entwicklung und ihr Leben in den älteren Lebensstadien. Larven reagieren zudem vielfach sensitiver auf Umwelteinflüsse als Adulte (Pörtner & Farrell 2008). Es konnte bereits oft beobachtet werden, dass sich verändernde Umweltfaktoren negativ auf die Larvalentwicklung und somit auch auf die weitere Entwicklung und Rekrutierung von Crustaceen auswirken (Dineen & Hines 1994, Vinuesa et al. 1985, Qiu & Qian 1999, Hamasaki 2003, Anger et al. 2004).

Bei der Wahl eines adäquaten Modellorganismus wurde die Seespinne *Hyas araneus* (L.) ausgewählt. Ihr Vorteil liegt in dem für dekapode Crustaceen typischen Kalkskelett, ihrer weiten latitudinalen Verbreitung (Christiansen 1969), und in der Einfachheit ihrer Hälterung (Anger & Nair 1979, Anger 1983, 1987).

Zur Bestimmung der Auswirkungen der Ozeanversauerung auf den physiologischen Temperaturtoleranzbereich von *Hyas araneus* zweier Populationen (Helgoland und Svalbard) wurden vielfältige physiologische und biochemische Methoden auf verschiedenen Organisationsebenen angewandt. Einleitend werden die methodischen Hintergründe beschrieben, die der Bestimmung des physiologischen Toleranzbereiches dienen. Mit den Untersuchungen zur akuten Temperaturtoleranz (siehe Kapitel 1.2) und den Enzymaktivitäten (siehe Kapitel 1.6.) wurden die Toleranzbereiche von adulten *H. araneus* ermittelt. Des Weiteren wurden bei larvalen *H. araneus* die Entwicklungsdauer, biochemische Parameter (siehe Kapitel 1.4.) und die Kalzifizierung (siehe Kapitel 1.5.) als Indikatoren der Auswirkungen der Ozeanversauerung auf den Temperaturtoleranzbereich der jeweiligen Population herangezogen.

1.2 Temperaturtoleranz

Lebewesen sind in ihrem natürlichen Habitat einem bestimmten Temperaturbereich ausgesetzt. Organismen entwickeln daher ein spezifisches Temperaturtoleranzfenster, welches ihre physiologische Kapazität und Grenzen beschreibt (Frederich & Pörtner

2000, Pörtner et al. 2005, Pörtner 2008, 2010). Durch die Untersuchungen des Sauerstoffpartialdruckes in der Hämolymphe und der Herzrate sollte die physiologische Toleranz der Seespinne *Hyas araneus* ermittelt werden. Das sich so ergebende spezifische Temperaturtoleranzfenster kann dann genutzt werden, um die Auswirkungen der Ozeanversauerung, erhöhtem PCO_2 oder verringertem pH, auf die Art bzw. Population zu beschreiben (Pörtner et al. 2005, Pörtner 2010).

Frederich und Pörtner (2000) ermittelten das spezifische Temperaturtoleranzfenster des dekapoden Krebses *Maja squinado* (Abb. 1.2.1). Die physiologische Toleranz wurde dabei durch den Sauerstoffpartialdruck in der Hämolymphe sowie der Herz- und Ventilationsrate bestimmt. Im Temperaturoptimum weist der Sauerstoffpartialdruck im Blut die höchsten Werte auf, so dass der Sauerstoffbedarf in den Organen und Zellen gedeckt werden kann und die Leistungsfähigkeit im Maximum liegt. Die Herzrate zeigt im Optimum einen exponentiellen Verlauf. Eingegrenzt wird der optimale Temperaturbereich durch die Pejus-Temperaturen (T_p I und T_p II), die den Beginn der Diskrepanz aus Sauerstoffbedarf und -bereitstellung aufzeigen.

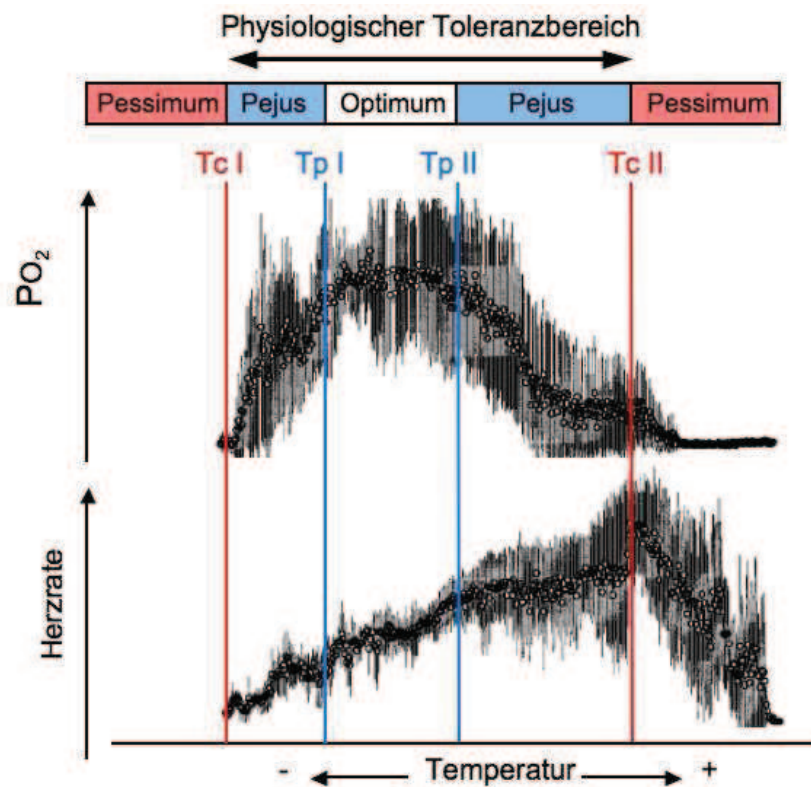


Abb. 1.2.1. Temperaturtoleranzfenster nach Frederich & Pörtner 2000.

Bei Erwärmung verbrauchen die Organe und Zellen mehr Sauerstoff. Die Folge ist ein Anstieg der Herz- und Ventilationsrate, um den erhöhten Bedarf durch eine gesteigerte Sauerstoffaufnahme und -verbreitung auszugleichen. Eine so erhöhte Sauerstoffbereitstellung kann auf Dauer jedoch nicht aufrechterhalten werden. Die zweite Pejustemperatur (T_p II) signalisiert den Beginn des abfallenden Sauerstoffgehaltes im Blut, da trotz der weiterhin erhöhten Herz- und Ventilationsrate nicht genug Sauerstoff bereitgestellt werden kann. An der oberen kritischen Temperatur (T_c II) sinken die Herz- und Ventilationsrate abrupt, da das System mehr Sauerstoff verbraucht als aufgenommen werden kann. Letztendlich kommt es zur Anaerobiose, die länger dauernd schließlich zum Tod des Organismus führt.

Sinkt die Temperatur unter die untere Pejus-Temperatur (T_p I) verringern sich die Ventilations- und Herzrate, wodurch auch der Sauerstoffpartialdruck in der Hämolymphe reduziert wird. Bei kälter werdenden Temperaturen werden die Aufnahme und der Transport von Sauerstoff immer unzureichender. Letztendlich kommt es beim Erreichen der unteren kritischen Temperatur (T_c I) zum Versagen der Ventilation, was eine Hypoxemie zur Folge hat. Der Organismus betreibt nun einen anaeroben Stoffwechsel, welche auf Dauer zum Tod führt.

1.3 Modellorganismus - *Hyas araneus* (L.)

1.3.1 Verbreitung

Die Seespinne *Hyas araneus* (L.) wird innerhalb der Crustacea in die Ordnung der Decapoda und in die Familie der Majidae eingeordnet. Sie ist im nordöstlichen Atlantik von der Deutschen Bucht bis in die Sub-Arktischen Gewässer um Svalbard anzutreffen (Abb. 1.3.1; Christiansen 1969). Adulte haben eine Carapaxbreite von bis zu 105 mm und leben auf sandigem, steinigem und felsigem Grund von weniger als 1 m bis zu 360 m Tiefe. Sie besiedeln jedoch hauptsächlich die Tiefen oberhalb von 50 m (Christiansen 1969).

In dieser Arbeit wurden Individuen aus zwei klimatisch weit auseinander liegenden Populationen der gemäßigten Zone von Helgoland (54°N) und der Sub-Arktischen Zone von Svalbard (79°N) herangezogen. Populationen, die an den Extremen eines so weiten latitudinalen Gradienten leben, unterscheiden sich in ihren Verbreitungsgrenzen und den dort herrschenden Temperaturbereichen. Die

Wassertemperaturen um Helgoland (Helgoländer Reede, Nordsee) schwanken im Jahresverlauf zwischen 3 und 18 °C mit einem Maximum von 20 °C in den Sommermonaten (Wiltshire und Manly 2004), während die Schwankungsbreite in den Sub-Arktischen Gewässern um Svalbard mit 0 bis 6 °C im Jahresgang sehr viel kleiner ist (Svendsen et al. 2002).



Abb 1.3.1. Verbreitung von *Hyas araneus* im Nord-ostatlantik (blau) mit fraglicher Verbreitung im Englischen Kanal (rot) (verändert nach Christiansen 1969).

1.3.2 Lebenszyklus von *Hyas araneus* der Helgolandpopulation

Die Seespinne *Hyas araneus* durchläuft während ihrer Entwicklung zum adulten Krebs verschiedene embryonale, larvale und juvenile Stadien (Abb. 1.3.2). Nach der synchronen Paarung und zweijähriger Embryonalentwicklung (Petersen 1995) entlassen die eiertragenden Weibchen um Helgoland im Februar, sobald die Temperatur wieder ansteigt, ihre Larven in das umgebende Wasser (Anger & Nair 1979). Anhand von Individuen der Helgolandpopulation konnte gezeigt werden, dass während der zwei Jahre der Embryonalentwicklung die Embryonen vier verschiedene Phasen durchlaufen (Petersen 1995): Phase I, die Furchung, dauert einen Monat. Nachfolgend tritt Phase II ein, die Gastrula, welche x-12 Monate dauert. Für die Phase III, die Differenzierung, brauchen die Embryonen 8 Monate. Phase IV, die Pre-Hatching-Phase findet in 1 bis 2 Monaten statt (Petersen 1995, Petersen & Anger 1997). Die Phase II ist eine Diapause. Die Länge dieser Phase entscheidet, ob eine einjährige oder zweijährige Embryonalentwicklung stattfindet. Die Ausdehnung der Embryonalentwicklung über zwei Jahre ist eine Anpassung von Organismen, welche eine hohe saisonale Abhängigkeit der Larven von planktischem Futter haben (Starr et al. 1994). Die lange Pausenperiode synchronisiert das Schlüpfen der Larven mit dem Auftreten von Futter im Plankton (Petersen 1995). Die Form der zweijährigen Embryonalentwicklung ist auch bei anderen dekapoden Crustaceen, wie *Chionectes oplio* und *Paralithodes camtschaticus*, verbreitet (Taylor et al. 1985, Jensen & Armstrong 1989).

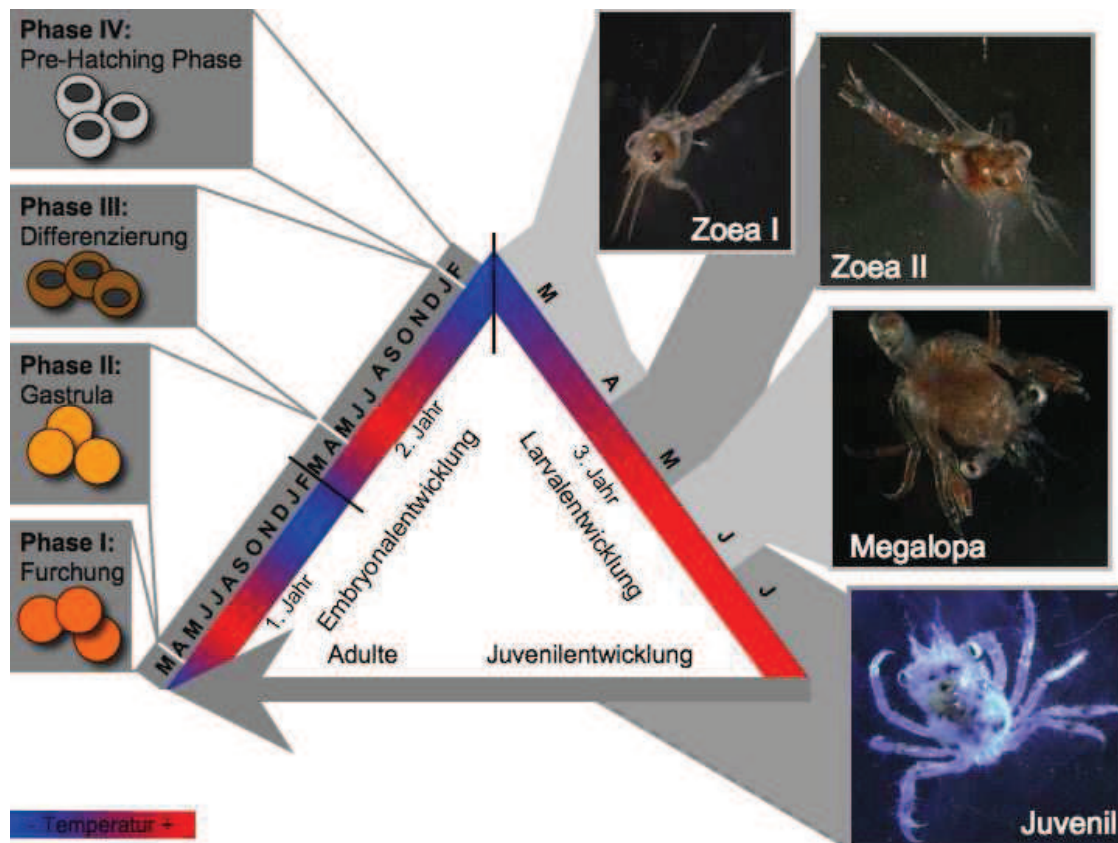


Abb. 1.3.2. Lebenszyklus der Seespinne *Hyas araneus* im Jahresverlauf von Helgoland (Temperatur 3 - 18 °C, blau bis rot; Großbuchstaben entsprechen Monatsabkürzungen). Von Embryonalentwicklung im 1. und 2. Jahr, Larvalentwicklung im 3. Jahr, über Juvenilentwicklung bis zum geschlechtsreifen Adulttier.

Die Entwicklung der *H. araneus*-Larven ist an die jeweiligen saisonalen Umgebungstemperaturen angepasst. Nach Anger (1983) und Anger & Nair (1979) entlassen eiertragende Weibchen der Population um Helgoland ihre Larven mit dem ersten Zoea-Stadium (Zoea I) von Mitte Februar bis Mitte März bei Umgebungstemperaturen von etwa 3 bis 4 °C. Die Zoea I-Larven, erkennbar an den ungestielten Augen, treten dann bis April bei Temperaturen bis 6 °C auf (siehe Abb. 1.3.2.). Nach der Häutung in das Zoea II-Stadium besitzen die Larven gestielte Augen und haben weiter an Größe zugenommen. Mit ihren Thorakopoden können sich die Zoea-Larven im Pelagial fortbewegen. Durch die langen Rücken- und Seitendornen können sich die Larven in einer bestimmten Schicht in der Wassersäule halten und werden zudem vor Predatoren geschützt (Anger 2001). Die Häutung der Zoea II in die Megalopa erfolgt ab Mai bei Temperaturen ab 9 °C. Als Megalopen gehen die Larven in eine semi-benthische Phase über. Megalopen treten dann von Mai bis Juli bei Temperaturen von 9 bis 14 °C auf und bewegen sich sowohl im Pelagial als auch im Benthos. Sie suchen nach einem passenden Habitat, um dort in das erste juvenile

Stadium (Krebs I) ab Juli zu metamorphosieren. Es folgen bis zu 30 juvenile Stadien, die dem Größenwachstum und der Ausbildung der Geschlechtsorgane dienen. Mit der Häutung zum adulten Tier sind die Krebse dann fortpflanzungsfähig. Über *Hyas araneus* aus Svalbard gibt es bis jetzt keine vergleichbaren Untersuchungen zur Embryonal- und Larvalentwicklung bei unterschiedlichen Temperaturen. In dieser Arbeit wurden nun erstmalig Studien zur Larvalentwicklung der Population um Svalbard vorgenommen.

1.4 Biochemische Zusammensetzung

Die wichtigsten Elemente im organischen Anteil des Trockengewichtes eines Organismus sind mit über 35 % der Kohlenstoff (C), mit 8 - 11 % der Stickstoff (N) und der Wasserstoff (H) mit 5 - 6 % (Childress & Nygaard 1974, Anger & Harms 1990, Minagawa et al. 1993, Normant et al. 2002). Einen weitaus geringeren Anteil machen die Elemente Sauerstoff, Phosphor und Schwefel aus. Aus der Bestimmung des Verhältnisses aus Kohlenstoff zu Stickstoff können Aussagen über den Lipid- und Proteinanteil in dem jeweiligem Gewebe oder Organismus gemacht werden (Anger 1998, 2001). Dies ist mittlerweile zu einer Standardmethode zur Ermittlung des Wachstums und der chemischen Zusammensetzung planktischer Organismen geworden (Dawirs 1980, Anger 1984b, Ikeda 1988, Ikeda & Skjoldal 1989, Lim & Hirayama 1991, Normant et al. 2002, Lovrich et al. 2003, Weiss et al. 2009). Ein hohes Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis (C/N-Verhältnis) signalisiert einen hohen Lipidanteil, wohingegen ein geringes C/N-Verhältnis einen hohen Proteinanteil aufzeigt (Anger & Harms 1990, Minagawa et al. 1993). Diese Rückschlüsse können aus der Funktion der jeweiligen Stoffe gezogen werden. So ist Kohlenstoff zum größten Teil in den langkettigen Fettsäuren der Lipide enthalten. Stickstoff dagegen ist ein wichtiger Bestandteil in den Aminogruppen der Proteine. Zusammen mit dem gemessenen Trockengewicht können Aussagen über die Fitness eines Individuums getroffen werden (Anger 2001).

Während eines Larvenstadiums ändern sich die biochemische Zusammensetzung und das Trockengewicht in einem speziellen Muster (Anger 1991, 1998, Anger & Ismael 1997, Anger et al. 2000). So steigen Trockengewicht und C/N-Verhältnis nach der Häutung (Postmolt-Phase) an, da in dieser Zeit das Wachstum zunimmt und Lipide

eingelagert werden. In der Intermolt-Phase befinden sich Trockengewicht und C/N-Verhältnis an ihrem Maximum. Kurz bevor die Larven sich erneut häuten (Premolt-Phase), sinken das Trockengewicht und das C/N-Verhältnis. Während der Premolt-Phase verändert sich der Körper der Larven: Enzyme, die für den Häutungsprozess wichtig sind, werden gebildet und Strukturproteine synthetisiert. Dies erfordert Energie, die aus dem Futter und den gespeicherten und umgeformten Lipiden gewonnen wird (Anger 1988, 1998).

Umweltfaktoren wie die Temperatur (Dawirs & Dietrich 1986, Weiss et al. 2009), die Salinität (Anger et al. 2000, Torres et al. 2002) oder die Futterverfügbarkeit (Dawirs 1987, Anger 1988) können das C/N-Verhältnis von Krebslarven verändern. Stressbedingt, z.B. durch Veränderungen der Umweltfaktoren, kommt es zum Rückgang des C/N-Verhältnisses und somit zu Veränderungen im Wachstum. Auch Hunger bewirkt eine Erniedrigung des C/N-Verhältnisses durch die Nutzung der energiereichen Lipide als Substrat für den Energiestoffwechsel (Anger 1988). Wie sich die Ozeanversauerung und Erwärmung auf die biochemische Zusammensetzung und somit auf die Fitness der *Hyas araneus*-Larven aus der jeweiligen Population auswirken, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.5 Kalzifizierung

Durch Umweltfaktoren wie pH, CO₂ oder Temperatur, kann das Exoskelett von Crustaceen beeinflusst werden (Cameron 1985b, Roca & Wansard 1997, Arnold et al. 2009, Clavier et al. 2009, Findlay et al. 2010). Diese Umweltfaktoren können beispielsweise morphologische Änderungen der Calcitstruktur im Exoskelett hervorrufen (Pratoomchat et al. 2002a), wodurch der Panzer womöglich keinen ausreichenden Schutz mehr gegen Predatoren und Krankheitserreger bieten kann. Die Kalzifizierung ist bei Krebsen außerhalb ihrer Habitatterperatur reduziert (Roca & Wansard 1997, Findlay et al. 2010). Auch erhöhte CO₂-Konzentrationen und erniedrigte pH-Werte stören die Kalzifizierung des Exoskelettes (Arnold et al. 2009, Findlay et al. 2010).

Während Entwicklung und Wachstum durchlaufen Crustaceen mehrere Häutungen, die jeweils mit einer Kalzifizierung des Exoskelettes einhergehen. Der Häutungsprozess verläuft in einem speziellen Muster mit vier verschiedenen Phasen

(Postmolt, Intermolt, Premolt, Ecdysis = Häutung). In der Postmolt-Phase erfolgt die erste Bildung der Cuticula durch Anlagerung von Chitin-Protein-Fasern an die Epi- und Exocuticula (Travis 1955, Pratoomchat et al. 2002a). Die organische Matrix besteht aus folgenden zwei Bestandteilen: der löslichen Matrix mit anionischen Proteinen, und der unlöslichen Matrix mit hydrophoben Proteinen. Ist die lösliche Matrix in einer freien Lösung, so hemmt sie die CaCO_3 -Kristallisation. Dagegen fördert sie die Kristallisation, wenn die lösliche Matrix mit der unlöslichen verbunden ist (Gunthorpe et al. 1990). Die unlösliche Matrix ist reich an Aspartat und phosphorylierten Serinresten, die mit Oligosacchariden Komplexe bilden, welche wiederum eine Oberfläche für das Kristallwachstum bieten (Coblentz et al. 1998). Die Kalzifizierung der Epi- und Exocuticula des Exoskelettes findet durch Einbindung von Ca^{2+} - und CO_3^{2-} -Ionen an bestimmten Keimbildungsorten in den Chitin-Protein-Fasern der Kutikula statt. In der Intermolt-Phase erfolgt das Dickenwachstum der Cuticula durch die vermehrte Einlagerung von Calcit und Magnesiumcalcit (Roer & Dillaman 1984). Wenn die Kalzifizierung abgeschlossen ist, schirmen große Makromoleküle die Keimbildungsorte zum Schutz ab (Coblentz et al. 1998). In der Premolt-Phase werden diese Makromoleküle durch Deglykolysierung, enzymatische Spaltung oder Änderungen in der Löslichkeit abgebaut, so dass die eingelagerten Mineralien vom Krebs resorbiert werden können. Die Cuticula löst sich von der Membran ab und der Krebs häutet sich (Roer & Dillaman 1984).

Bevor Kalziumkarbonat in die Chitinschicht des Exoskelettes der Crustaceen eingelagert werden kann, wird Kalzium vom umgebenden Wasser über die Kiemen aufgenommen (Cameron & Wood 1985, Neufeld & Cameron 1993, Flik et al. 1994) und über Kalziumkanäle durch die basolaterale Membran in die Zellen transportiert. Der weitere Transport des Kalziums erfolgt dann durch die apikale Membran mittels der Ca^{2+} -ATPase in die Mitochondrien und andere Organellen. Zur Mineralisierung der Kutikula werden Kalzium-Ionen über die Hämolymphe mit Hilfe von Ca^{2+} -ATPase, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauscher über die basolaterale Membran zum Carapax transportiert (Neufeld & Cameron 1993, Wheatly 1999). Das Karbonat wird aus der Reaktion von CO_2 mit Wasser gewonnen, welche durch die Carboanhydrase katalysiert wird (Giraud 1981, Henry & Cameron 1983). Im Carapax werden Kalzium und Karbonat zu CaCO_3 verbunden und in die Chitinmatrix eingelagert (Travis 1955, Cameron 1985a, b, Wheatly 1999). Ein reduzierter pH-Wert hemmt jedoch den

Einstrom von Kalzium- und Karbonat-Ionen in die Zellen und hat somit auch einen negativen Einfluss auf die Kalzifizierung des Exoskelettes (Cameron 1985b).

Neben der Einlagerung in das Exoskelett dienen Karbonat-Ionen und Bikarbonat-Ionen (HCO_3^-) im extra- und intrazellulären Raum der Pufferung von Azidosen (reduzierter pH-Wert durch erhöhte CO_2 -Konzentration). HCO_3^- kann durch Pumpen, wie die $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher, aus den Zellen in den extrazellulären Raum gelangen und dort überschüssige Protonen binden, wodurch einer Azidose entgegen gesteuert werden kann (Cameron 1985a, b, Melzner et al. 2009b). Die Karbonat-Ionen, die im Exoskelett der Crustaceen an Kalzium gebunden sind, können für diese Pufferung wieder gelöst werden. Die Rücklösung wird dabei auch mittels der Carboanhydrase katalysiert, so dass Ca^{2+} und HCO_3^- wieder zur Pufferung einer Azidose zur Verfügung stehen (Henry et al. 1981, Cameron 1985 a, b, Pratoomchat et al. 2002a).

1.6 Das Enzym Natrium-Kalium ATPase (Na^+/K^+ -ATPase)

Die Na^+/K^+ -ATPase gewährleistet die Bildung eines Ionengradienten über die Membran einer Zelle. Durch ATP-Hydrolyse des Enzyms wird Energie frei, die den aktiven Transport von drei Natriumionen aus der Zelle und zwei Kaliumionen in die Zelle gewährleistet (Hilden & Hokin 1975). Der entstandene Gradient kann nun viele Transportprozesse, wie z.B. die Aufrechterhaltung der pH-Homöostase in den Kiemenzellen durch die Kopplung der Na^+/K^+ -ATPase mit dem Na^+/H^+ -Austauscher oder $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter, fördern (Mantel 1985, Henry & Wheatly 1992, Pörtner et al. 2004). Die Aktivität des Enzyms Na^+/K^+ -ATPase kann sich bei Crustaceen abhängig vom Salzgehalt und der Temperatur ändern (Neufeld et al. 1980, Corotto & Holliday 1996, Charmantier 1998, López Mananes et al. 2002, Stillman 2002, Wang et al. 2006). In Abhängigkeit zu ihrer osmoregulativen Fähigkeit weisen die Arten unterschiedliche Na^+/K^+ -ATPase-Aktivitäten auf (Neufeld et al. 1980, Corotto & Holliday 1996, Charmantier 1998, López Mananes et al. 2002).

Die Untersuchung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität und -Expression in den Kiemen von *Hyas araneus* aus den jeweiligen Populationen soll Aufschluss über populationsspezifische Anpassungen des Enzyms geben, um weitere Aussagen über die Temperaturtoleranz der Art treffen zu können.

1.7 Fragestellungen

In dieser Arbeit werden sowohl die Effekte von erhöhten CO₂-Konzentrationen als auch der Temperatur auf adulte und larvale Seespinnen (*Hyas araneus*) untersucht. Im Mittelpunkt steht die Ermittlung eines Temperaturtoleranzfensters an adulten *H. araneus* und die Untersuchung enzymatischer Anpassungen der jeweiligen Population an ihre Habitatterperaturen. Des Weiteren wurden an verschiedenen Larvenstadien die synergistischen Wirkungen der Ozeanversauerung und der Temperaturerhöhung auf die Fitness und auf die Kalzifizierung untersucht. Fitness wird in diesem Fall gemessen am Wachstum und Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis der Organismen. Diese Arbeit soll neue Erkenntnisse zu Auswirkungen erhöhter CO₂-Konzentrationen auf die Temperaturtoleranz von *H. araneus* in verschiedenen Lebensstadien und deren jeweilige Anpassungsstrategien ermöglichen. Hierzu steht die Beantwortung folgender Fragen im Mittelpunkt:

Wie wirkt sich die Ozeanversauerung auf die Temperaturtoleranz von adulten *Hyas araneus* von Helgoland aus?

– **Publikation I** “Impact of anthropogenic ocean acidification on thermal tolerance of the spider crab *Hyas araneus*”

Zur Beantwortung der Frage wurden als Parameter der Sauerstoffpartialdruck in der Hämolymphe und die Herzrate von adulten *Hyas araneus* bei akuter Temperaturänderung gemessen und das Temperaturtoleranzfenster ermittelt. Die Krebse wurden weiterhin mit erhöhten CO₂-Konzentrationen inkubiert, um mögliche Beeinträchtigungen ihrer physiologischen Temperaturtoleranz durch eine Ozeanversauerung und Erwärmung aufzuzeigen.

Werden die Larvalstadien von *Hyas araneus* aus verschiedenen Populationen durch die Erwärmung und die Ozeanversauerung unterschiedlich beeinflusst?

– **Publikation II** “Effects of ocean acidification and warming on the larval development of the spider crab *Hyas araneus* from different latitudes (54° vs. 79°N)”

Die Frage wurde mit Larven von *Hyas araneus* aus geographisch weit auseinander liegenden Populationen von Helgoland (54°N) und Svalbard (79°N) beantwortet.

Hierfür wurden die Parameter der Entwicklungszeit, des Wachstums und der biochemischen Zusammensetzung herangezogen. Ausgehend von geographisch unterschiedlichen Habitatterperaturen (3 - 18 °C: Helgoland, 0 - 6 °C: Svalbard) sollten mögliche unterschiedliche Anpassungsstrategien aufgezeigt werden.

Haben Änderungen in der Temperatur und erhöhte CO₂-Konzentrationen Auswirkungen auf die Kalzifizierung der Larven von *Hyas araneus* verschiedener Klimazonen?

– **Publikation III** “Impacts of ocean warming and acidification on larval calcification of the spider crab *Hyas araneus* (L.) from different latitudes (54° vs 79°N)”

Für diese Fragestellung wurden unterschiedliche Larvenstadien der beiden Populationen von Helgoland und Svalbard auf ihren Kalziumgehalt untersucht. Da Kalzium-Ionen im Exoskelett an Karbonat-Ionen gebunden sind, kann freier Bikarbonat als Puffer gegen eine Azidose wirken. Inwiefern sich die Ozeanversauerung auf die Kalzifizierung der Larven auswirkt, steht im Fokus der Untersuchungen.

Zeigen adulte *Hyas araneus* aus verschiedenen Klimazonen Anpassungen in der Ionenregulation durch Na⁺/K⁺-ATPase an ihre jeweiligen natürlichen Temperaturbereiche?

- **Publikation IV** “Characterization of the Na⁺/K⁺-ATPase in gills of the spider crab *Hyas araneus* (L.) from different latitudes (54° and 79°N)”

Zur Beantwortung der Frage wurden die Kiemen der Tiere von Helgoland und Svalbard näher untersucht. Dabei wurden die Aktivität und Expression der Na⁺/K⁺-ATPase in den Kiemenbögen bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen.

2. Material und Methoden

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Methoden, die bei den jeweiligen Lebensstadien der Seespinne *Hyas araneus* der beiden Populationen Helgoland und/oder Svalbard unter den jeweiligen Temperatur- und/oder CO₂-Bedingungen zum Einsatz kamen.

Tabelle 2.1. Übersicht der Methodenwahl:

| | | Methode | Population / Bedingung |
|-------------------------------------|------------------------|---|---|
| adulte <i>H. araneus</i> | Publikation I | akutes Temperaturtoleranzfenster: Ermittlung über PeO ₂ und Herzrate | Helgoland Temperatur (0 – 25 °C) CO ₂ (Normokapnie, 710 ppm, 3000 ppm) |
| | Publikation IV | Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-Aktivität und - Expression | Helgoland / Svalbard Temperatur (5 °C, 10 °C) |
| larvale <i>H. araneus</i> | Publikation II | Entwicklungszeit, biochemische Zusammensetzung | Helgoland / Svalbard Temperatur (3, 9, 15 °C) CO ₂ (Normokapnie, 710 ppm, 3000 ppm) |
| | Publikation III | Kalzifizierung | |

2.1 Modellorganismus *Hyas araneus*

Adulte nordische Seespinnen *Hyas araneus* aus einer Population der gemäßigten Zone und einer der Sub-Arktischen Zone wurden von Tauchern von August bis Oktober 2007 um Helgoland (Deutsche Bucht, Nordsee, 54° 11'N, 7° 53'O) bzw. im August 2008 um Svalbard gesammelt. Tiere aus dem Gebiet um Helgoland wurden nachfolgend per Schiff an das Alfred-Wegener Institut, Bremerhaven, transportiert und bei 10 ± 0.2 °C in Tanks mit belüftetem Seewasser (32 - 33 ‰) bis zum Experiment gehältert.

Eiertragende Weibchen wurden im Januar 2008 mit dem Forschungskutter "Uthörn" mit einem Grundschleppnetz in der Tiefen Rinne vor Helgoland gesammelt. Bis zum Schlupf der Larven wurden die Weibchen in der Biologischen Anstalt Helgoland (Alfred-Wegener Institut) im Durchfluss bei 4 - 6 °C, 32 ‰ gehältert.

Im Juli 2008 sammelten Taucher adulte *H. araneus*-Männchen und eiertragende Weibchen im Kongsfjord auf Svalbard (Norwegen, 78° 55'N, 11° 57'O). Vor Ort wurden die Tiere in Durchflussbecken bei 4 - 5 °C gehältert. Für den zweitägigen Lufttransport zum Alfred-Wegener Institut, Bremerhaven, wurden die Tiere einzeln in 1 l - Kautex-Flaschen mit 1/3 Seewasser und 2/3 Sauerstoff, verpackt. Die Kautex-Flaschen wurden auf Eis in Coleman-Boxen (100 x 50 x 50 cm) ans Alfred-Wegener Institut, Bremerhaven, transportiert, wo die Krebse bei 5 °C (32 - 33 ‰) im Durchfluss gehalten wurden. Die eiertragenden Weibchen wurden im Februar darauf abermals in 1 l - Kautex-Flaschen verpackt und per Schiff zur Biologischen Anstalt Helgoland transportiert. Bis zum Schlupf der Larven wurden die Weibchen im Durchfluss bei 4 - 5 °C (32 - 33 ‰) gehältert.

2.2 Versuche mit adulten *Hyas araneus*

2.2.1 Messung des Temperaturtoleranzfensters unter verschiedenen CO₂-Bedingungen

Für die Messung des Temperaturtoleranzfensters (Publikation I) wurden adulte *Hyas araneus* auf einem Gitter fixiert (Abb. 2.1.). Zur Messung des Sauerstoffpartialdrucks in der Hämolymphe wurde eine Sauerstoffoptode (PreSens GmbH, Regensburg, Deutschland) in ein vorpräpariertes Loch eingeführt. Für die Platzierung der Sauerstoffoptode wurde direkt über dem Herzen mit einem Handbohrer ein Loch in den Carapax gebohrt. Ein zweites Loch für die Messsonde des Laser-Dopplers wurde posterior vom ersten Loch gebohrt. Bei beiden Bohrungen wurde darauf geachtet, die Hypodermis nicht zu verletzen. Zur Befestigung der Sauerstoffoptode wurde ein Stück Latex mit Sekundenkleber auf dem Carapax befestigt und anschließend mit Gewebeband fixiert. Mit dem Endstück einer unflexiblen Venennadel (nach Strauss, BRAUN, Deutschland) und Dentalwachs wurde ein Adapter passend für die Sauerstoffoptodenspritze geformt und auf das Latexstück geklebt. Mit einer scharfen Kanüle wurde durch den Adapter, das Latex und die Hypodermissschicht ein Loch ins

Tier gestochen. Zur Vermeidung der Hämolympfgerinnung wurde die Glasfaser der Optode mit einer Heparinlösung (5000 U/ml) behandelt. Anschließend wurde die Optode durch den Adapter ins Tier gesteckt und die Glasfaser der Sauerstoffoptode aus der Spritzennadel gefahren. Für die Herzratenmessung wurde die Messsonde des Laser-Doppler Perfusion Monitors (Periflux System 5000, Perimed AB, Järfälla, Schweden) auf das zweite Loch mit Sekundenkleber fixiert. Nach der Implantation der Sensoren konnten sich die Krebse bei 10 °C für 24 h erholen.

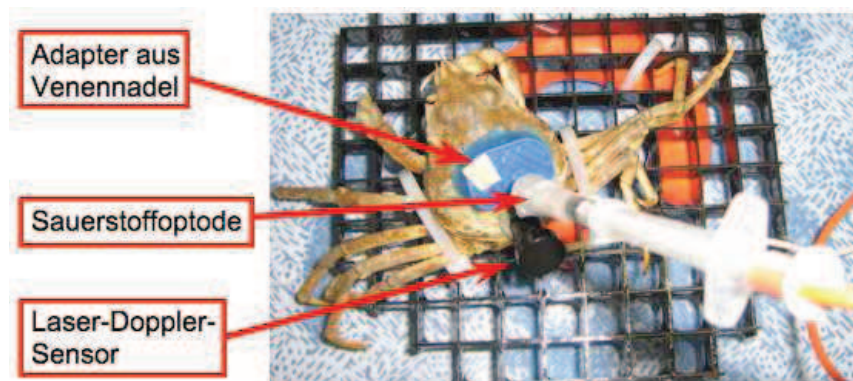
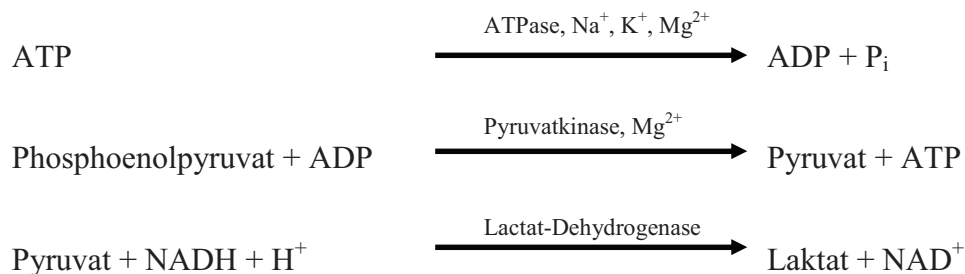


Abb. 2.1. Präparation einer *Hyas araneus* zur Messung von Hämolympf-PeO₂ mit einer Sauerstoffoptode und Herzrate mit dem Laser-Doppler System

Die präparierten Krebse (je zwei pro Messung) wurden in das Versuchsbecken (75 l Seewasser) gesetzt und der Sauerstoffpartialdruck und die Herzrate bei akuter Temperaturänderung detektiert. Während der Temperaturtoleranzmessung wurden die Krebse unterschiedlichen CO₂-Konzentrationen im Seewasser ausgesetzt. Für die normokapnischen Bedingungen (380 ppm CO₂) wurde das Seewasser mit Luft begast. Die Konzentrationen von 710 ppm und 3000 ppm CO₂ wurden mit Wösthoff-Gasmischpumpen (Typ 2M303/a-F-T, 5kM303/a-F, 5kM402-F) aus CO₂-freier Luft und CO₂ gemischt. Durch die Zufuhr CO₂-haltiger Luft sank der pH-Wert bei 3000 ppm CO₂ von 8.0 auf 7.3 bzw. auf 7.8 bei 710 ppm CO₂. Vor den Experimenten wurden die Versuchsorganismen 24 h bei 10 °C im Versuchsbecken unter der jeweiligen Versuchsbedingung akklimatisiert, wodurch ein neues Säure-Basen-Gleichgewicht in den Körperflüssigkeiten von dekapoden Krebsen erreicht wird (Truchot 1984). Mit Hilfe eines Thermostaten (Lauda, T1200) wurde die Temperatur von 10 auf 0 °C abgekühlt bzw. von 10 auf 25 °C erwärmt, bei einer Temperaturänderung von jeweils 1 °C pro Stunde. Die Genauigkeit der Temperaturrampe betrug dabei 1.0 ± 0.2 °C/h für die Abkühlung bzw. 1.0 ± 0.1 °C/h für die Erwärmung.

2.2.2 Na^+/K^+ -ATPase- Aktivitäts – und Expressionsmessung

Zur Bestimmung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität und Expression in den Kiemen adulter *Hyas araneus* wurden von den beiden Populationen (Helgoland, Svalbard) jeweils fünf Individuen untersucht (Publikation IV). Jedem Tier wurden die sechs Kiemenbögen entnommen, gewogen, in Stickstoff schock-gefroren und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Proben wurden nach Deigweiher et al. (2008) behandelt und die Enzymaktivität der jeweiligen Kiemenbögen bei 5 und $10\text{ }^\circ\text{C}$ mit einem gekoppeltem Enzymtest bestimmt. In dem Enzymtest ist die Hydrolyse des ATPs mit der Oxidation des NADH durch die Hilfsenzyme Pyruvatkinase und Laktat-Dehydrogenase gekoppelt:



Im Gegensatz zu den oxidierten Formen besitzen die reduzierten Formen der Kofaktoren ihr Absorptionsmaxima bei 339 nm . Die Oxidation des NADH durch die Laktat-Dehydrogenase wurde durch die Bestimmung der Extinktionsabnahme bei 339 nm photometrisch mit einem DU7400i Spektrometer (Beckman Coulter, Deutschland) gemessen. Der Anteil der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität an der gesamten ATPase-Aktivität wurde durch die Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase mittels 5 mM Ouabain bestimmt. Die Enzymaktivität wurde dann mittels des Extinktionskoeffizienten für NADH von $\varepsilon = 6.31\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ und in mM verbrauchtes ATP pro g Frischgewicht (fwt) und Stunde angegeben.

Die Bestimmung der Na^+/K^+ -ATPase-Expression in den Kiemenextrakten erfolgte mittels Immunoblotting nach Deigweiher et al. (2008). Mit SDS-Polyacrylamidgelen wurden die Proteine aufgetrennt und nachfolgend auf eine Membran geblottet (Western-Blotting). Die Blots wurden danach mit dem ersten Antikörper ($\alpha 5$) über Nacht bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, gewaschen und mit dem zweiten Antikörper (Goat-Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase-Konjugat (1:2000)) inkubiert. Die Chemolumineszenz der Antikörperbindung wurde mit einer CCD-

Kamera (LAS-1000, Fuji, Japan) gemessen. Die Signalintensität wurde mit der AIDA Image Analyser Software (Vers. 3.53, Raytest, Deutschland) kalkuliert und der Na^+/K^+ -ATPase Proteingehalt letztendlich als dimensionslose Einheit pro Probenvolumen (25 μl) pro g Frischgewicht angegeben.

2.3 Versuche mit larvalen *Hyas araneus*

2.3.1 Hälterung der Larven

Eiertragende Weibchen der Helgoland- und Svalbardpopulation wurden einzeln in Durchflussbecken (20 l) bei einer Wassertemperatur von 4 - 5 °C, einer Salinität von 32 ‰ und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 h gehalten. Für den Durchfluss wurde im oberen Bereich des Beckens nahe der Wasserlinie ein Abfluss angebracht. Wenn die Larven schlüpften bewegten sie sich nach oben, angezogen durch das Licht und dem Wassersog, und gelangten über einen Schlauch jeweils in ein Auffangsieb (200 μm), welches unter Wasser stand. Die frisch geschlüpften Larven in den jeweiligen Sieben konnten somit den Weibchen zugeordnet werden. Von drei Weibchen der Helgolandpopulation und vier Weibchen der Svalbardpopulation wurden jeweils 350 Larven auf sieben 0.5 l - Kautex-Flaschen (50 Individuen pro Replikat) pro Versuchsbedingung (Normokapnie, 710 ppm und 3000 ppm CO_2) in die temperierten Räume bei 3, 9 und 15 °C verteilt (7 x 50 Larven pro Weibchen x 9 Behandlungen).

Für die normokapnische Inkubation wurde 0.2 μm filtriertes Seewasser benutzt und in den jeweiligen Räumen temperiert. Für die Inkubation bei 710 ppm CO_2 wurde 0.2 μm filtriertes Seewasser in 60 l - Flaschen gefüllt und mit einem Gasgemisch (0.071 % Kohlendioxid, 21 % Sauerstoff, Rest Stickstoff) begast, bis der pH-Wert des Wassers einen Wert von 7.8 ± 0.05 erreichte. Entsprechend wurde auch eine Vorratsflasche mit Seewasser und einem Gasgemisch von 3000 ppm CO_2 (0.3 % Kohlendioxid, 21 % Sauerstoff, Rest Stickstoff) vorbereitet. Diese Vorratsflasche hatte nach der Äquilibration einen pH-Wert von 7.3 ± 0.05 . Das vorpräparierte Seewasser wurde auf die Flaschen (60 l) der jeweiligen Temperaturen (3, 9, 15 °C) verteilt. Der pH-Wert des Wassers wurde überprüft. Im Abstand von 14 Tagen wurden Proben zur nachträglichen Messung der Alkalinität (total alkalinity, TA) (siehe Publikation II) genommen.

Das Wasser der Larven wurde täglich gewechselt, um die Larvalentwicklung zu dokumentieren (Publikation II) sowie um tote Larven und überschüssiges Futter zu

entfernen. Hierzu wurden die Larven in eine 0.5 l - Schale überführt und die Kautex-Flasche mit neuem präpariertem Seewasser gefüllt. Nachfolgend wurden die Larven wieder mit einer Glaspipette in die Kautex-Flasche transferiert. Futter (*Artemia* sp.-Nauplien, 50 - 100 Individuen pro ml) wurde hinzugegeben und die Flasche zur Vermeidung eines Gasaustausches mit der Umgebungsluft mit einem Deckel verschlossen. Zoea I-Larven des gleichen Weibchens und derselben Behandlung, die sich am gleichen Tag häuteten, wurden aus den ursprünglich 7 Flaschen in eine neue Flasche überführt. Dabei wurden 0.2 l - Kautex-Flaschen für bis zu 12 Individuen und 0.5 l - Kautex-Flaschen für 12 bis 30 Individuen genutzt. Nach der Häutung der Zoea II-Larven ins Megalopa-Stadium wurden, abhängig von der Anzahl der Individuen pro Weibchen und Behandlung eins bis fünf Megalopen in 0.2 l - Kautex-Flaschen und sechs bis 15 Megalopen in 0.5 l - Kautex Flaschen überführt. Bei 9 und 15 °C wurde die Entwicklung der Larven bis zur Metamorphose zum juvenilen Stadium (Krebs I) dokumentiert. Bei 3 °C konnten die Megalopen aus Zeitmangel nur bis zur Probennahme am Tag 14 gehältert werden.

Von allen Behandlungen wurden Larven für die biochemische Analyse und zur Ermittlung des Ca^{2+} -Gehaltes beprobt. Für die biochemische Analyse wurden fünf Replikate folgender Entwicklungsstadien untersucht: frisch geschlüpfte Zoea I-Larven (vier Individuen pro Replikat), frisch gehäutete Zoea II-Larven (zwei Individuen pro Replikat), und eine Megalopa pro Replikat am 0. Tag (M0) (= frisch gehäutete Megalopa), 7. Tag (M7) und 14. Tag (M14). Zur Bestimmung des Ca^{2+} -Gehaltes wurden frisch geschlüpfte Zoea I-Larven und Megalopen am 3. Tag (M3), 7. Tag (M7) und am 14. Tag (M14) mit jeweils 6 bis 13 Replikaten genommen.

2.3.2 Biochemische Analysen

Bei der Probennahme zur biochemischen Analyse und für das Trockengewicht wurden die Larven (siehe Publikation II) auf ein Sieb transferiert und mit destilliertem Wasser besprüht. Mit Hilfe eines unter dem Sieb befindlichen Tuches wurde überschüssiges Wasser von den Larven entfernt. Die Larven wurden in zuvor abgewogenen Zinnkartuschen platziert und bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden im Vakuum bei -53 °C über Nacht gefriergetrocknet (CHRIST freeze-dryer ALPHA 1-4 LSC, UK) und ihr Trockengewicht mit einer Feinwaage (Genauigkeit 0.1 µg, Sartorius SC2 Mikrowaage, Deutschland) bestimmt. Mit einem C-H-N Analysator (Elementar Vario

MICRO CUBE, Deutschland) wurden anschließend der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt der Larven gemessen.

2.3.3 Messung von Kalzium mit der Ionenchromatographie

Zur Messung der Kalziumkonzentration wurden die Larven von *Hyas araneus* an den jeweiligen Probenahmetagen (siehe Publikation III) wie unter 2.3.2 beschrieben entnommen und gereinigt. Die Larven wurden gewogen und anschließend nach Zugabe von 100 µl Millipore-Wasser bei -20 °C gelagert. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben aufgetaut und mit 200 µl einer 1 M HCl-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die hochkonzentrierte Salzsäure lösen sich alle Kalzium-Ionen von gebundenen Karbonat-Ionen aus dem Carapax, da die Protonen der Salzsäure mit dem Karbonat reagieren und so die Kalzium-Ionen aus der Bindung drängen. Aufgrund dessen befinden sich nach dieser Behandlung alle gelösten Kalzium-Ionen der jeweiligen Larve in der Probe. Nachfolgend wurden die Proben für 5 min mit 20800 rpm zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 50 µl zur 1/10 fachen Verdünnung mit Millipore-Wasser abgenommen. Die Kalzium-Ionen der Larven wurden mit einem Ionenchromatographen ICS-2000 (Dionex, Idstein, Deutschland) nach Wittmann et al. (2010) gemessen. Zur Auftrennung der Kationen wurde eine Säule (IonPac CS15) mit Methansulfonsäure (30 mmol/l) als Laufmittel mit einer Durchflussrate von 0.36 ml/min bei 40 °C verwendet. Der Kalziumgehalt wurde in mg/l in Relation zum Dionex Six Cation-II Standard berechnet und als mg/l pro mg Frischgewicht angegeben.

2.4 Statistische Analysen

Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad Prism (Version 4, GraphPad Software Inc., USA) und STATISTICA (Version 7.1, StatSoft Inc., USA). Die Daten wurden auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Homogenität der Varianzen (Bartlett's Test) getestet. Statistische Unterschiede wurden mit einem 5 % Konfidenzniveau mit der Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgendem Tukey post hoc-Test bzw. einem Student's T-Test und Chi²-Test ermittelt. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism (Version 4, GraphPad Software Inc., USA) als Mittelwerte (arithmetisches Mittel) ± Standardabweichung oder Standardfehler dargestellt.

3. Publikationen

Liste der bereits veröffentlichten und beabsichtigten Publikationen und Erklärungen über den von mir geleisteten Anteil.

Publikation I

Kathleen Walther, Franz J. Sartoris, Christian Bock, Hans O. Pörtner (2009). Impact of anthropogenic ocean acidification on thermal tolerance of the spider crab *Hyas araneus*. Biogeosciences 6: 2207-2215

Die Idee der Versuche stammt von mir und wurde mit den Koautoren konzeptionell erarbeitet. Die Experimente wurden von mir durchgeführt. Die erste Version des Manuskripts zu dieser Veröffentlichung wurde von mir geschrieben und in Zusammenarbeit mit den Koautoren überarbeitet.

Publikation II

Kathleen Walther, Klaus Anger, Hans O. Pörtner (2010) Effects of ocean acidification and warming on the larval development of the spider crab *Hyas araneus* from different latitudes (54° vs. 79°N).

Marine Ecology Progress Series, akzeptiert

Die Idee der Versuche stammt von mir. Sie wurden konzeptionell mit dem Zweitautor abgesprochen. Die Experimente wurden von mir durchgeführt. Die erste Version des Manuskripts wurde von mir angefertigt und in Zusammenarbeit mit den Koautoren überarbeitet.

Publikation III

Kathleen Walther, Franz J. Sartoris, Hans O. Pörtner (2010) Impacts of ocean warming and acidification on larval calcification of the spider crab *Hyas araneus* (L.) from different latitudes (54° vs 79°N).

Marine Biology, eingereicht

Die Idee der Versuche stammt von mir und konzeptionell mit dem Zweitautor abgesprochen. Das Manuskript zu dieser Veröffentlichung wurde von mir verfasst und mit dem Zweit- und Drittautor überarbeitet.

Publikation IV

Kathleen Walther, Tina Brenneis, Magnus Lucassen, Hans O. Pörtner. Characterization of the Na⁺/K⁺-ATPase in gills of the spider crab *Hyas araneus* (L.) from different latitudes (54° and 79°N)

in Bearbeitung

Die Idee der Versuche stammt von mir und wurde mit dem Drittautor konzeptionell erarbeitet. Die Durchführung der Experimente erfolgte zusammen mit dem Zweitautor. Das Manuskript der Veröffentlichung wurde von mir geschrieben und mit dem Dritt- und Viertautor überarbeitet.

Publikation I

Impact of anthropogenic ocean acidification on thermal tolerance of the spider crab *Hyas araneus*

K Walther, FJ Sartoris, C Bock, HO Pörtner

2009

Biogeosciences

6: 2207-2215

Impact of anthropogenic ocean acidification on thermal tolerance of the spider crab *Hyas araneus*

K. Walther, F. J. Sartoris, C. Bock, and H. O. Pörtner

Alfred-Wegener-Institute for Polar and Marine Research, Department Integrative Ecophysiology, Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven, Germany

Received: 16 February 2009 – Published in Biogeosciences Discuss.: 10 March 2009

Revised: 21 September 2009 – Accepted: 23 September 2009 – Published: 15 October 2009

Abstract. Future scenarios for the oceans project combined developments of CO₂ accumulation and global warming and their impact on marine ecosystems. The synergistic impact of both factors was addressed by studying the effect of elevated CO₂ concentrations on thermal tolerance of the cold-urythermal spider crab *Hyas araneus* from the population around Helgoland. Here ambient temperatures characterize the southernmost distribution limit of this species. Animals were exposed to present day normocapnia (380 ppm CO₂), CO₂ levels expected towards 2100 (710 ppm) and beyond (3000 ppm). Heart rate and haemolymph PO₂ (P_eO₂) were measured during progressive short term cooling from 10 to 0°C and during warming from 10 to 25°C. An increase of P_eO₂ occurred during cooling, the highest values being reached at 0°C under all three CO₂ levels. Heart rate increased during warming until a critical temperature (T_c) was reached. The putative T_c under normocapnia was presumably >25°C, from where it fell to 23.5°C under 710 ppm and then 21.1°C under 3000 ppm. At the same time, thermal sensitivity, as seen in the Q₁₀ values of heart rate, rose with increasing CO₂ concentration in the warmth. Our results suggest a narrowing of the thermal window of *Hyas araneus* under moderate increases in CO₂ levels by exacerbation of the heat or cold induced oxygen and capacity limitation of thermal tolerance.

1 Introduction

The ongoing increase of CO₂ in the atmosphere is a key driver of global warming (IPCC, 2001, 2007) and causes an increase in accumulation of CO₂ in the oceans leading to an acidification. Caldeira and Wickett (2005) modelled

different future scenarios for CO₂ concentrations in the atmosphere and ocean. By 2100 they projected atmospheric and surface ocean levels of 710 ppm CO₂ and for the year 2300 much beyond depending on the continued use of fossil fuel resources. Values reached may potentially comprise 3000 ppm CO₂. CO₂ penetrates the surface ocean by air-to-sea equilibration and is distributed by ocean circulation (Orr et al., 2001). In the studied area, the German Bight, North Sea, water depth is less than 100 m (Pohlmann, 1996). In this case, the whole water body will be equilibrated with CO₂. The ongoing and predicted increase of CO₂ levels leads to questions about the potential impact of ocean acidification on marine ecosystems in times of ocean warming (cf. Pörtner et al., 2005; Pörtner, 2008). Physiological mechanisms affected by CO₂ have been identified, however, past studies on the influence of CO₂ on crustaceans were conducted with a different focus and either used concentrations of about 10 000 ppm CO₂ (Cameron, 1978, 1985; Wickins, 1984; Cameron and Iwama, 1987; Metzger et al., 2007; Pane and Barry, 2007) or rarely more realistic scenarios (e.g. about 800 ppm used by Spicer et al., 2007). For reliable conclusions concerning the impact of CO₂ on the physiology and fitness of crustaceans in the near future, it is necessary, however, to include realistic CO₂ concentrations in those studies, as postulated for 2100 (710 ppm) or beyond (3000 ppm), and combine them with changing temperatures.

The present study investigates the impacts of CO₂ and temperature on the physiology of *Hyas araneus* in the context of the thermal tolerance concept originally developed in crustaceans, namely by Frederich and Pörtner (2000) for *Maja squinado*. The thermal tolerance window as characterized by temperature dependent haemolymph oxygen partial pressure (P_eO₂), heart and ventilation rates comprises the temperature range of aerobic performance (or scope). The thermal optimum is the temperature where performance is maximal, supported by high haemolymph oxygen tension, and maximum scope (i.e. increase above maintenance) for heart



Correspondence to: K. Walther
 (kathleen.walther@awi.de)

Biogeosciences 6: 2207-2215, 2009

Impact of anthropogenic ocean acidification on thermal tolerance of the spider crab *Hyas araneus*

K. Walther*, F. J. Sartoris, C. Bock, and H. O. Pörtner

Alfred-Wegener-Institute for Polar and Marine Research, Department Integrative Ecophysiology, Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven, Germany

*Correspondence to: K. Walther (Kathleen.Walther@awi.de)

Abstract. Future scenarios for the oceans project combined developments of CO₂ accumulation and global warming and their impact on marine ecosystems. The synergistic impact of both factors was addressed by studying the effect of elevated CO₂ concentrations on thermal tolerance of the cold-eurythermal spider crab *Hyas araneus* from the population around Helgoland. Here ambient temperatures characterize the southernmost distribution limit of this species. Animals were exposed to present day normocapnia (380 ppm CO₂), CO₂ levels expected towards 2100 (710 ppm) and beyond (3000 ppm). Heart rate and haemolymph PO₂ (P_eO₂) were measured during progressive short term cooling from 10 to 0 °C and during warming from 10 to 25 °C. An increase of P_eO₂ occurred during cooling, the highest values being reached at 0 °C under all three CO₂ levels. Heart rate increased during warming until a critical temperature (T_c) was reached. The putative T_c under normocapnia was presumably > 25 °C, from where it fell to 23.5 °C under 710 ppm and then 21.1°C under 3000 ppm. At the same time, thermal sensitivity, as seen in the Q_{10} values of heart rate, rose with increasing CO₂ concentration in the warmth. Our results suggest a narrowing of the thermal window of *Hyas araneus* under moderate increases in CO₂ levels by exacerbation of the heat or cold induced oxygen and capacity limitation of thermal tolerance.

1 Introduction

The ongoing increase of CO₂ in the atmosphere is a key driver of global warming (IPCC, 2001, 2007) and causes an increase in accumulation of CO₂ in the oceans leading to an acidification. Caldeira and Wickett (2005) modelled different future scenarios for CO₂ concentrations in the atmosphere and ocean. By 2100 they projected atmospheric and surface ocean levels of 710 ppm CO₂ and for the year 2300 much beyond depending on the continued use of fossil fuel resources. Values reached may potentially comprise 3000 ppm CO₂. CO₂ penetrates the surface ocean level by air-to-sea equilibration and is distributed by ocean circulation (Orr et al., 2001). In the studied area, the German Bight, North Sea, the water depth is less than 100m (Pohlmann, 1996). In this case, the whole water body will be equilibrated with CO₂. The ongoing and predicted increase of CO₂ levels leads to questions about the potential impact of ocean acidification on marine ecosystems in times of ocean warming (cf. Pörtner et al., 2005; Pörtner, 2008). Physiological mechanisms affected by CO₂ have been identified, however, past studies on the influence of CO₂ on crustaceans were

conducted with a different focus and either used concentrations of about 10 000 ppm CO₂ (Cameron, 1978, 1985; Wickins, 1984, Cameron and Iwama, 1987; Metzger et al., 2007; Pane and Barry, 2007) or rarely more realistic scenarios (e.g. about 800 ppm used by Spicer et al., 2007). For reliable conclusions concerning the impact of CO₂ on the physiology and fitness of crustaceans in the near future, it is necessary, however, to include realistic CO₂ concentrations in those studies, as postulated for 2100 (710 ppm) or beyond (3000 ppm), and combine them with changing temperatures.

The present study investigates the impacts of CO₂ and temperature on the physiology of *Hyas araneus* in the context of the thermal tolerance concept originally developed in crustaceans, namely by Frederich and Pörtner (2000) for *Maja squinado*. The thermal tolerance window as characterized by temperature dependent haemolymph oxygen partial pressure (P_eO₂), heart and ventilation rates comprises the temperature range of aerobic performance (or scope). The thermal optimum is the temperature where performance is maximal, supported by high haemolymph oxygen tension, and maximum scope (i.e. increase above maintenance) for heart and ventilation rates. The earliest limits of the thermal tolerance range with ecological relevance (Pörtner and Knust, 2007) are reflected by high and low pejus temperatures (T_p). Warming leads to rising oxygen demand that can initially be met by oxygen supply through enhanced ventilation and heart rate (Zainal et al., 1992; Frederich and Pörtner, 2000). The upper T_p indicates the point, where ventilation and heart rates level off and remain constant indicating capacity limitation. Haemolymph oxygen partial pressure decreases within the subsequent pejus range, as a result of a mismatch developing between the rising oxygen demand for maintenance and the limited capacities of ventilation and circulation in oxygen supply. Beyond pejus range, a critical temperature defines the onset of anaerobic metabolism, where accumulation of L-lactate, succinate and inorganic phosphate sets in and aerobic scope vanishes (Frederich and Pörtner, 2000; Melzner et al., 2006). In the following pessimum range animal life is sustained for limited time only. Such critical temperatures can also be identified from patterns of P_eO₂ or heart rate. A drop in heart rate characterizes the critical temperature as it coincides with the onset for anaerobic metabolite accumulation (Frederich and Pörtner, 2000; Melzner et al., 2006). As P_eO₂ levels depend on oxygen consumption and are controlled by ventilation and heart rate the determination of critical thermal maxima in different crab species from heart rate measurements (Ahsanullah and Newell, 1971; Cuculescu et al., 1998; Stillman and Somero, 1996; Worden et al., 2006) would likely match critical

thermal limits according to the concept of oxygen and capacity limited thermal tolerance.

The impact of moderate elevations in CO₂ on thermal window may be small in the thermal optimum but may exert stronger effects on thermal limits as hypothesized earlier (Pörtner et al., 2005; Pörtner and Farrell, 2008). At thermal extremes it may exacerbate the reduction in aerobic scope towards thermal extremes (cf. Metzger et al., 2007) which will decrease functional capacity and fitness and may minimize survival in the field once animals (Pörtner and Knust, 2007).

Little is known about the effect of CO₂ on temperature tolerance of cold-temperate invertebrates, especially in species at the border of their temperature dependent distribution range along a latitudinal gradient. The spider crab *Hyas araneus* (L.) was chosen as a model for a cold temperate crustacean. *Hyas araneus* is found in the North Atlantic from the North Sea, near Helgoland, Germany, to the Arctic around Svalbard, Norway (Christiansen, 1969). During the year the mean ambient temperature of the North Sea varies between 3°C and 18°C and reaches maxima of about 20°C in summer (Wiltshire and Manly, 2004). In Svalbard waters *Hyas araneus* is exposed to temperatures between 0°C and 6°C (Svendsen et al., 2002). The species lives on stony, sandy and soft bottom from <1 down to 360 m, most commonly at depths less than 50 m. Males may reach a carapace length up to 105 mm (Christiansen, 1969).

The present study investigates the thermal window of the *Hyas araneus* population around Helgoland in the context of the large temperature fluctuations experienced by the species in the North Sea. One further question addressed in this study is to what extent CO₂ affects the wide thermal tolerance range and whether this effect sets in under expected CO₂ accumulation scenarios in both atmosphere and surface waters.

2 Materials and methods

2.1 Animals

Adult *Hyas araneus* (L.), including males and females with the similar size (carapace length: 68.8±2.8 mm) were caught between August and October 2007 around Helgoland, Germany. The females used were all in the same reproductive stage and were not carrying egg masses. The animals were held in tanks with aerated re-

circulating natural seawater at $10 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 32-33‰ salinity, pH 8.0 and a 12 h light cycle at the Alfred-Wegener-Institute in Bremerhaven, Germany, for at least 4 weeks before the beginning of the experiments. The animals were fed twice a week with pieces of mussels (*Mytilus edulis*). A thermostat (Lauda, T1200) ensured tight temperature control in the experimental setup tank. The temperature ramp starting from a control temperature of 10°C was coded using the wintherm plus program (Version 2.2) of the thermostat. The water was cooled from 10°C to 0°C and warmed continuously from 10°C to 25°C at a rate of 1°C per h. The accuracy of the temperature ramp was $1 \pm 0.2^\circ\text{C/h}$ for cooling and $1 \pm 0.1^\circ\text{C/h}$ for warming protocols.

2.2 Surgical procedures

Prior to experimentation animals were prepared for continuous simultaneous measurements of arterial haemolymph oxygen partial pressure (P_{eO_2}) and of heart rate. Briefly, two holes were drilled through the carapace, one directly over the heart, avoiding injury to the hypodermis. This hole was covered with latex dam to prevent haemolymph loss. The sleeve of an inflexible venipuncture needle (after Strauss, BRAUN, Germany) was used as an adapter for fixation of the oxygen optode. This adapter was fixed with dental wax over the drilled hole. A second hole was drilled behind the optode preparation for fixation of the Doppler probe used for heart rate measurements.

2.3 Oxygen measurements

Measurements of arterial P_{eO_2} were carried out with microoptodes (NTH-PSt1-L51TF-PC3,1-NS 35x1,20-YOP, PreSens GmbH, 93053 Regensburg, Germany). Data were recorded on-line by use of temperature compensation via TX2-A oxygen monitors and software (Oxy View TX2 C 4.02) (PreSens Regensburg, Germany). Optodes were calibrated in air-saturated millipore water (100%) and in oxygen-free seawater, using sodium disulfide (0%). Haemolymph clotting around the oxygen probes was prevented by rinsing the probes in a heparin solution (5000 U/ml) prior to use. The tip of the optode was inserted through the adapter and latex dam into the pericardial sinus and fixed with parafilm. Oxygen values were recorded as % air saturation and converted to P_{eO_2} .

2.4 Heart rate measurements

Measurements of heart rate were carried out with a non-invasive laser Doppler perfusion monitor (LDPM PeriFlux System 5000, Perimed AB, Järfälla, Sweden) as described by Lannig et al. (2008). Prior to the experiments, the probe was two-point calibrated. The laser Doppler signal was monitored by chart 5 (AD instruments). Heart rates (beats/min) were derived from regular changes in the laser Doppler signal caused by fluctuating haemolymph flow. Laser Doppler values were averaged for individual temperature steps (0.1°C for the warming ramp, 0.2°C for the cooling ramp).

2.5 CO₂ incubations

After the implantation of the sensors, animals were allowed to recover for 24 h in 75-l seawater tanks at 10°C. During the experiments animals were exposed to different CO₂ concentration (normocapnia, 710 ppm, 3000 ppm) in the seawater. For normocapnic conditions (380 ppm CO₂) seawater was bubbled with air. For exposure to different CO₂ concentrations Wösthoff gas mixing pumps (Typ 2M303/a-F-T, 5kM303/a-F, 5kM402-F) were used to mix CO₂-free air with CO₂. During exposure to 3000 ppm CO₂ water, water pH dropped from 8.0 to 7.3 (expected pH value calculated as 7.29). Equilibration with 710 ppm CO₂ concentration caused a pH decrease from 8.0 to 7.8 (expected value calculated as pH 7.80). Prior to exposure to the temperature ramp animals were exposed for 24 h to 10°C at each particular CO₂ concentration. New acid-base equilibria were reached in body fluids of the crabs within 24 h (Truchot, 1984). All animals survived experimentation.

2.6 Data analysis

Data are presented as means \pm SE. Statistical significance was tested using one-way ANOVA and post hoc Tukey tests (GraphPad Software, Prism 4). Discontinuities in the slopes of heart rate changes vs. temperature were calculated from intersections of fitted two-phase regressions according to the minimum sum of squares and were presented as breakpoints and critical temperatures (T_c). Linear regression lines were calculated with Prism 4 (GraphPad Software). Nonlinear regression curves were fitted using Boltzmann

sigmoidal equation at Prism 4 (GraphPad Software). Q_{10} values were calculated from the exponential phases of heart rate increments, after De Wachter & Wilkens (1996): $Q_{10} = (f_{H2}/f_{H1})\exp[10/(t_2-t_1)]$ with t = temperature and f_H = heart rate.

3 Results

Acute cooling from 10°C to 0°C resulted in a slight increase of arterial P_eO_2 under all three conditions, i.e. normocapnia, 710 ppm, as well as 3000 ppm CO_2 , starting from values of P_eO_2 which fell with rising CO_2 levels (Fig. 1a). Under normocapnia mean P_eO_2 ranged from 9.49 kPa at 10°C to 13.24 kPa at 0°C, under 710 ppm values ranged from 8.72 kPa to 13.56 kPa and, under 3000 ppm, from 6.05 kPa to 10.65 kPa. The P_eO_2 values of crabs incubated under 3000 ppm were significantly lower than in animals under both normocapnia and 710 ppm (ANOVA, $p < 0.001$).

Heart rate decreased between 10°C and 6°C with different slopes depending on CO_2 concentration (Fig. 1b). The heart rate of crabs incubated under 3000 ppm CO_2 fell more strongly than in animals incubated under 710 ppm and normocapnia. The statistical comparison of the three data sets obtained between 10°C and 0°C revealed a significant difference between animals under normocapnia and 3000 ppm as well as between those under 710 ppm and 3000 ppm (ANOVA, $p < 0.001$). *Hyas araneus* specimens incubated under 3000 ppm displayed a lower heart rate than those under 710 ppm or normocapnia. Heart rate remained more or less constant between 6 and 0°C under all conditions, at a rate of 37.2 ± 1.2 beats/min under 3000 ppm, 39.64 ± 1.4 beats/min under 710 ppm and 40.27 ± 1.4 beats/min under normocapnia.

Upon acute warming from 10°C to 25°C haemolymph P_eO_2 values of *Hyas araneus* decreased (Fig. 2a), from a maximum of about 8.5 kPa at 10°C under normocapnia to a minimum of about 2.5 kPa at 25°C. Under the same warming protocol mean P_eO_2 in crabs under 710 ppm fell from 6.3 kPa to 0.8 kPa, and in specimens under 3000 ppm from 6.9 kPa to 1.37 kPa. Differences were statistically significant between data obtained under normocapnia and 710 ppm (ANOVA, $p < 0.001$) as well as between those under 3000 ppm and normocapnia or 710 ppm (ANOVA, $p < 0.01$).

Depending on CO_2 treatment heart rate of *Hyas araneus* displayed different patterns upon acute warming between 10°C and 25°C (Fig. 2b). Lowest rates were seen under normocapnia with relatively stable mean values between 43.7 and 55.0 beats/min. In contrast, heart rate increased under 710 ppm from 48.9 beats/min at 10°C to a

maximum of 63.17 beats/min at 22.4°C leveling off towards 61.67 beats/min at 23.5°C and decreasing rapidly thereafter to 48.44 beats/min at 24.8°C. Crabs under 3000 ppm displayed an increase in heart rate from 52.49 beats/min at 10°C to 65.6 beats/min at 18.4°C leveling off to 62.52 beats/min at 21.1°C and decreasing thereafter to 50.05 beats/min at 24°C. Data under 3000 ppm were significantly different from those obtained under normocapnia or 710 ppm (ANOVA, $p < 0.001$).

Figure 3 presents the comparison of P_eO_2 values and heart rates within the whole temperature range of all three incubations (normocapnia (Fig. 3a), 710 ppm (Fig. 3b) and 3000 ppm (Fig. 3c)). Contrasting trends result for P_eO_2 and heart rate. Clear changes in the development of heart rate upon warming under 710 ppm and 3000 ppm define the critical temperatures (T_c) by calculated breakpoints. The upper T_c under 710 ppm was 23.5°C and under 3000 ppm 21.1°C. Under normocapnic conditions no breakpoint could be identified in the observed temperature range between 10 and 25°C, confirming that the T_c is found beyond 25°C under normocapnia ($T_c > 25^\circ C$).

Accordingly, Q_{10} values of *Hyas araneus* heart rates (calculated from the exponential phases of heart rate increments between 6 and 12°C) increased from 1.25, (heart rate increment: 44.26 beats/min to 50.60 beats/min) under normocapnia to 1.55 (42.27 to 55.06 beats/min) under 710 ppm CO_2 and 2.05 (heart rate increment: 35.79 to 55.08 beats/min) under 3000 ppm CO_2 , (Fig. 4). These data demonstrate an incremental response to temperature with increasing CO_2 levels.

4 Discussion

4.1 Thermal tolerance window of *Hyas araneus*

The aim of the present study was to illustrate the impact of anthropogenic CO_2 accumulation in the oceans on the thermal tolerance window of the spider crab (*Hyas araneus*) population from Helgoland. For an examination of the thermal tolerance window haemolymph oxygen partial pressure (P_eO_2) and heart rate were measured during warming and cooling protocols.

Hyas araneus exposed to the cooling protocol from 10°C to 0°C (Fig. 1a) displayed a moderate increase in arterial haemolymph oxygen partial pressure while heart rate decreased. Specimens exposed to warming from 10°C to 25°C (Fig. 2a) experienced a decrease in mean P_eO_2 value while heart rate rose under normocapnic

conditions. The comprehensive depiction in Fig. 3 shows that arterial haemolymph P_{eO_2} continued to rise down to 0 °C. These data contrast the first such data set elaborated in the spider crab *Maja squinado* (Frederich and Pörtner, 2000) where the temperature dependent pattern of arterial P_{eO_2} characterized the thermal tolerance window. In *Maja squinado* P_{eO_2} fell upon cooling until a lower critical temperature was reached, subsequently anaerobic metabolism set in and indicated cold induced oxygen deficiency (Frederich and Pörtner, 2000).

The optimum temperature range of *Maja squinado* was seen between low and high pejus temperatures of 8.9 and 17.8°C, respectively (Frederich and Pörtner, 2000), with a maximum arterial P_{eO_2} of 92.6 mmHg, equivalent to 12.3 kPa, which was more or less stable between those so-called pejus thresholds. The highest P_{eO_2} value recorded in *Hyas araneus* was 13.6 kPa at the coldest temperature of 0°C. These data indicate that the optimum performance range of *Hyas araneus* is shifted to colder temperatures when compared to *Maja squinado*. As *Hyas araneus* reached their highest arterial P_{eO_2} values in the cold this may indicate that the species experiences no oxygen limitation at extremely cold temperatures, at least in its central organs close to the heart. However, recent data indicate that venous oxygen tensions may more closely reflect thermal limitation (F. Giomi, personal communication). Limitation in the perfusion of peripheral organs associated with low venous oxygen tensions or in general, in functional capacity upon further cooling, may thus occur in similar ways as shown in *Maja squinado* (Bock et al., 2001). Due to such capacity limitation in neuromuscular systems all reptant decapod crustaceans were hypothesized to be excluded from permanently low temperatures of -1°C in polar oceans (Frederich et al., 2000).

The range of thermal tolerance of *Hyas araneus* is mirrored in its range of natural distribution from the North Sea around Helgoland, Germany, northward to the Arctic around Svalbard, Norway (Christiansen, 1969). *Hyas araneus* can thus be characterized as a cold-eurythermal species with a lower thermal optimum range than seen in the warm-eurythermal *Maja squinado* (Frederich and Pörtner, 2000). Mean ambient water temperature of the North Sea at Helgoland Roads is about 3°C in winter and reaches 18°C, maximally 20°C, in summer (Wiltshire and Manly, 2004). Temperatures in Svalbard waters fluctuate between 0 and 6°C (Svendsen et al., 2002). This wide range of habitat temperatures implies a wide thermal tolerance range of this spider crab.

The heart rate of *Hyas araneus* decreased exponentially between 10°C and 0°C

under normocapnic conditions (Fig. 1b). Heart rate reached 37.2 beats/min at 0°C. This value appears high compared to the 20 beats/min reported for *Hyas araneus* at 0°C (Frederich et al., 2000). In *Maja squinado*, heart rate at 0°C, below the lower critical temperature and within the pessimum range was 10 beats/min. A lower heart beat rate might not only reflect thermal limitation but also relate to the somewhat larger body size of *M. squinado* (carapace length: 142.5±30.5 mm (Bernárdez et al., 2005) compared to carapace length: 68.8±2.8 mm in *H. araneus*) (Ahsanullah and Newell, 1971; DeFur and Mangum, 1979). *Maja squinado*'s heart rates in the optimum range (9.3°C to 17.3°C) were about 40 to 60 beats/min (Frederich and Pörtner, 2000), at the low end of rates seen in *H. araneus* at 10°C and beyond. Close to 0°C, high P_eO₂ values combined with relatively high heart rates of *Hyas araneus* reflect maintenance of performance at cold temperatures. The rise in arterial P_eO₂ in the cold reflects the facilitation in oxygen supply in cold waters, once tissue functional capacities are cold adapted. This facilitation is due to rising oxygen solubility in the cold in water and body fluids combined with a putative cold induced reduction of metabolic rates (cf. Pörtner, 2002). This conclusion is supported by the relaxed oxygen supply situation and the respective molecular to systemic adaptations of polar stenotherms (cf. Pörtner, 2006).

Under normocapnia and both elevated CO₂ tensions tested *Hyas araneus* heart rate decreased from 10 to 6°C and was nearly constant between 6 and 0°C, reflecting the lower end of an exponential decline phase which characterizes the lower end of the thermal window. This pattern is similar to the pattern of oxygen consumption within thermal tolerance windows as seen in the squat lobster *Munida rugosa* (Zainal et al., 1992) and in other marine invertebrates, e.g. the lugworm, *Arenicola marina* (Wittmann et al., 2008). Upon warming from 10 to 25°C the heart rate of *Hyas araneus* remained more or less constant under normocapnic conditions (Fig. 2b). The exponential phase of the heart rate was seen between 6 and 12°C under all CO₂ conditions. The upper point of change between exponential and linear phase is defined as the upper pejus temperature, where the circulatory performance of *H. araneus* from the Helgoland population reaches its upper capacity limit. At higher temperatures than T_p the analysis revealed no further discontinuities in the normocapnic data (Fig. 3). For comparison, heart rate data of *Maja squinado* displayed a break at 31.5°C, close to their critical temperature identified by the onset of anaerobic metabolism (Frederich and Pörtner, 2000). We conclude that the upper critical temperature of the *Hyas araneus* from the population at Helgoland under normocapnia is likely reached above 25°C.

The observations that the maximal P_{eO_2} of *Hyas araneus* is found close to 0°C, that the upper pejus temperature is likely seen around 10°C to 12°C and that the critical temperature of *Hyas araneus* is found above 25°C indicate that the width of the pejus range starting beyond 10°C to 12°C is similar or somewhat broader than that of *Maja squinado* which displays a pejus range between 17.3 and 31.1°C (Frederich and Pörtner, 2000). This and the progressive rise in P_{eO_2} within the optimum range towards the more extreme cold distinguishes *Hyas araneus* as a cold-eurythermal species from the warm-eurythermal *Maja squinado*.

4.2 CO₂ effects on thermal tolerance

During exposure to increased CO₂ concentrations (710 ppm and 3000 ppm) the P_{eO_2} of *Hyas araneus* displayed various decline phases between 0°C and 25°C resembling those under normocapnic conditions (Fig. 3). The same was true for the pattern of heart rate. However, levels of heart rate and P_{eO_2} differed between CO₂ levels. Heart rate resulted lower between 10 and 0°C under 3000 ppm than under 710 ppm or normocapnia. This observation together with a trend for P_{eO_2} to be lower under high CO₂ levels indicate a reduction in functional capacity of oxygen supply in CO₂ exposed specimens in the cold.

Above 10°C, CO₂ concentration influenced the temperature dependent rise in heart rate, which resulted steeper with higher CO₂ levels. The increase in heart rate under 3000 ppm CO₂ was larger than under 710 ppm or under normocapnia (Fig. 2). The stronger thermal stimulation of heart rate under increasing CO₂ levels may reflect a response to lower oxygen tensions and/or a chemosensory response. It may also reflect a stronger increase in metabolic rate. Exposure to acidification likely results in enhanced ventilation and a parallel rise in heart rate, which supports CO₂ release and thus the alleviation of CO₂ induced pH disturbances (cf. Pörtner et al., 2005).

Starting from a putative T_c above 25°C for *Hyas araneus* under normocapnic conditions CO₂ clearly induces a reduction in upper critical temperature to 23.5°C under 710 ppm and to 21.1°C at 3000 ppm (Fig. 3). These results confirm those obtained earlier in *Cancer pagurus* by Metzger et al. (2007), where measurements of PaO_2 demonstrated a downward shift of critical temperature from 20.5°C (normocapnia) to 15.5°C under 1% CO₂ (= 10 000 ppm CO₂). All of these findings support the hypothesis that with higher CO₂ concentrations and a stronger heat induced stimulation of heart

rate the upper critical temperature falls, as a result of synergistic effects of temperature and CO₂. In contrast to observations in the cold it may also involve a CO₂ induced stimulation of metabolic costs in the warmth.

The additional decrement in heart rate at low temperatures may possibly involve an accumulation and effect of adenosine under CO₂ exposure. Adenosine was found to accumulate under elevated CO₂ levels and depress ventilation rate in *Sipunculus nudus* (Reipschläger et al., 1997). The role of pH in this effect is not clear (Pörtner, 2008). In crustaceans, adenosine also depresses spontaneous activity and the responsiveness of interneurons to electrical and chemical stimuli in the brain (Derby et al., 1987) and elicits bradycardia (Brevard et al., 2003). In contrast, adenosine can display a stimulatory effect on heart rate, haemolymph flow and scaphognathite frequency (Maurer et al., 2008; Stegen and Grieshaber, 2001). This apparent discrepancy resembles the contrasting CO₂ effects at low and at high temperatures. A stimulatory effect might in fact be involved in the increase in heart rate with rising CO₂ concentrations in the warmth (Fig. 4). Further experiments are required to test these hypotheses.

Stillman and Somero (1996) identified upper thermal limits in heart rates of the high intertidal crab *Petrolisthes cinctipes* and the low intertidal crab *Petrolisthes eriomerus*, which correlated with the natural habitat temperature. Heart rate measurements of *Petrolisthes* species identified a critical temperature which in the light of our present data and those by Frederich and Pörtner (2000) may indicate a shift from aerobic to anaerobic metabolism. The low intertidal crab *Petrolisthes eriomerus* displayed a narrower thermal tolerance window and a lower T_c of 26.6°C with some accumulation of L-lactate at 25°C in comparison to the high intertidal crab *Petrolisthes cinctipes* ($T_c=31.5^\circ\text{C}$) (Stillman and Somero, 1996). The example of low and high intertidal *Petrolisthes* species illustrates the specialization of marine species on limited thermal ranges and the ability to live near their thermal limits. For eurythermal *Hyas araneus* we suggest, that the thermal tolerance window enables the large scale biogeographical distribution of the species. Under normocapnia, the response of *Hyas araneus* from Helgoland resembles the one of the high intertidal species *P. cinctipes*. In contrast, *Hyas araneus* under elevated CO₂ showed a response similar to *P. eriomerus*, which is a low intertidal species and does not possess such a wide thermal tolerance range. A CO₂ induced narrowing of the thermal tolerance will therefore most likely restrict the geographical distribution of a species. *Hyas araneus* from Helgoland would

already exploit its upper pejus range during present summers (temperature maxima about 20°C; Wiltshire and Manly, 2004), however without reaching the upper T_c . The situation may change under elevated CO₂ concentrations of 3000 ppm (scenario 2300), where the critical temperature of *Hyas araneus* was determined at 21.1°C, which would imply an increase in heat stress during extreme summers and elevated mortality rates.

A schematic model of heart rate changes in *Hyas araneus* illustrates how the thermal tolerance window is narrowed under the influence of CO₂ (Fig. 4). The CO₂ induced rise in Q_{10} values in the exponential phases of heart rate may be involved in eliciting the narrowing of thermal windows, in similar was as the Q_{10} enhancement of metabolic rate as recently seen in the lugworm *Arenicola marina* (Wittmann et al., 2008). In the lugworm model the thermal tolerance window is influenced by seasonal acclimatization to temperature resulting in a narrower window during winter, associated with lower metabolic rates and higher Q_{10} values than in summer (Wittmann et al., 2008).

We can conclude that CO₂ induced ocean acidification has the potential to cause a narrowing of thermal windows. The present mechanism based projections indicate that specimens from the southernmost population of a species, when permanently exposed to acidification may lose their capability to acclimate to extreme temperatures. In the future, long term exposures which mimic the long term nature of ocean acidification scenarios more closely will have complement the present experiments. The North Sea around Helgoland showed a warming trend during the last 40 years of 1.1°C to a mean temperature of 18°C and with maximum temperatures of about 20°C (Wiltshire and Manly, 2004). Personal observations indicate a drastic decrease in the abundance of *H. araneus* around Helgoland, which might be linked with summer warming. The present study emphasizes that a further increase in ambient temperature as predicted by the IPCC (2001, 2007) combined with increased ocean acidification (Caldeira and Wickett, 2005) may cause animals to reach their physiological limits even sooner. As a consequence *Hyas araneus* may lose its southern habitats and experience a stronger northward shift of biogeographical boundaries.

Acknowledgements. This work is a contribution to the "European Project on Ocean Acidification" (EPOCA) which received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 211384. EPOCA is endorsed by the International Programme LOICZ. Supported by the Mar Co

POL I research program of Alfred-Wegener-Institute. We would like to thank Timo Hirse and Katherina Schoo for excellent technical assistance.

References

- Ahsanullah, M. and Newell, R. C.: Factors affecting the heart rate of the shore crab *Carcinus maenas* (L.), *Comp. Biochem. Physiol.*, 39A, 277-287, 1971.
- Bernárdez, C., González-Gurriarán, E., García-Calvo, B., Corgos, A, and Freire, J.: Movements of juvenile and adult spider crab (*Maja squinado*) in the Ria da Coruna (N-W Spain), *Aquatic telemetry: advances and applications. Proceedings of the Fifth Conference on Fish Telemetry held in Europe. Ustica, Italy, 9-13 June 2003, Rome, FAO/COISPA, 295 pp., 2005.*
- Bock, C., Frederich, M., Wittig, R.-M. and Pörtner, H. O.: Simultaneous observations of haemolymph flow and ventilation in marine spider crabs at different temperatures: a flow weighted MRI study, *Magn. Reson. Imaging*, 19, 1113-1124, 2001.
- Brevard, M. E., Duong, T. Q., King, J. A. and Ferris, C. F.: Changes in MRI signal intensity during hypercapnic challenge under conscious and anesthetized conditions, *Magnetic Resonance Imaging*, 21, 995-1001, 2003.
- Caldeira, K. and Wickett, M. E.: Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean, *J. Geophys. Res.*, 110, C09S04, doi:10.1029/2004JC002671, 2005.
- Cameron, J. N.: Effects of Hypercapnia on Blood Acid-Base Status, NaCl Fluxes, and Trans-Gill Potential in Freshwater Blue crabs, *Callinectes sapidus*, *J. Comp. Physiol.*, 123, 137-141, 1978.
- Cameron, J. N.: Compensation of hypercapnic acidosis in the aquatic blue crab, *Callinectes sapidus*: the predominance of external sea water over carapace carbonate as the proton sink. *J. Exp. Biol.*, 114, 197-206, 1985.
- Cameron, J. N. and Iwama, G. K.: Compensation of progressive hypercapnia in channel catfish and blue crabs, *J. Exp. Biol.*, 133, 183-197, 1987.
- Christiansen, M. E. (Ed.): *Crustacea Decapoda Brachyura*, in: *Marine Invertebrates of Scandinavia*, No. 2, Universitetsforlaget, Oslo, 1969.
- Cuculescu, M., Hyde, D. and Bowler, K.: Thermal tolerance of two species of marine crab, *Cancer pagurus* and *Carcinus maenas*, *J. Therm. Biol.*, 23, 107-110, 1998.
- DeFur, P. L. and Mangum, C. P.: The effects of environmental variables on the heart

- rate of invertebrates, *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A, 283-294, 1979.
- Derby, C. D., Ache, B. W. and Carr, W. E. S.: Purinergic modulation in the brain of the spiny lobster, *Brain Research*, 421, 57-64, 1987.
- Frederich, M. and Pörtner, H. O.: Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*, *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 279, R1531-R1538, 2000.
- Frederich, M., Sartoris, F. J., Arntz, W. E. and Pörtner, H. O.: Haemolymph Mg^{2+} regulation in decapod crustaceans: Physiological correlates and ecological consequences in polar areas, *J. Exp. Biol.*, 203, 1383-1393, 2000.
- IPCC: Climate Change 2001: Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, 2001.
- IPCC: Climate Change 2007, Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, 2007.
- Lannig, G., Cherkasov, A. S., Pörtner, H. O., Bock, C. and Sokolovy, I. M.: Cadmium-dependent oxygen limitation affects temperature tolerance in eastern oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin), *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294, R1338-R2346, 2008.
- Maurer, G., Wilkens, J. L. and Grieshaber, M. K.: Modulatory effects of adenosine and adenine nucleotides on different heart preparations of the American lobster, *Homarus americanus*, *J. Exp. Biol.*, 211, 661-670, 2008.
- Melzner, F., Bock, C. and Pörtner, H. O.: Critical temperatures in the cephalopod *Sepia officinalis* investigated using *in vivo* ^{31}P NMR spectroscopy, *J. Exp. Biol.*, 209, 891-906, 2006.
- Metzger, R., Sartoris, F. J., Langenbuch, M. and Pörtner, H. O.: Influence of elevated CO_2 concentrations on thermal tolerance of the edible crab *Cancer pagurus*, *J. Therm. Biol.*, 32, 144-151, 2007.
- Orr, J.C., Maier-Reimer, E., Mikolajewicz, U., Monfray, P., Sarmiento, J.L., Toggweiler, J.R., Taylor, N.K., Palmer, J., Gruber, N., Sabine, C.L., Le Quéré, C., Key, R.M. and Boutin, J.: Estimates of anthropogenic carbon uptake from four three-dimensional global ocean models. *Global Biogeochemical Cycles*, 15, 1, 43-60, 2001.
- Pane, E. F. and Barry, J. P.: Extracellular acid-base regulation during short-term hypercapnia is effective in a shallow-water crab, but ineffective in a deep-sea crab. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 334, 1-9, 2007.

- Pohlmann, T.: Predicting the thermocline in a circulation model of the North Sea – Part I: model description, calibration and verification. *Continental Shelf Research*, 16, 7, 131-146, 1996.
- Pörtner, H. O.: Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchies of thermal tolerance in animals, *Comp. Biochem. Phys. A*, 132, 739-761, 2002.
- Pörtner, H. O., Langenbuch, M. and Michaelidis, B.: Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: From Earth history to global change, *J. Geophys. Res.*, 110, C09S10, doi:10.1029/2004JC002561, 2005.
- Pörtner, H. O.: Climate-dependent evolution of Antarctic ectotherms: an integrative analysis, *Deep-Sea Res.*, II, 53, 1071-1104, 2006.
- Pörtner, H. O. and Knust, R.: Climate Change Affects Marine Fishes Through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance, *Science*, 315, 95-97, doi:10.1126/science.1135471, 2007.
- Pörtner, H. O.: Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 373, 203-217, 2008.
- Pörtner, H. O. and Farrell, A. P.: Physiology and Climate Change, *Science*, 322, 690-692, doi:10.1126/science.1163156, 2008.
- Reipschläger, A., Nilsson, G. E. and Pörtner, H. O.: A role for adenosine in metabolic depression in the marine invertebrate *Sipunculus nudus*, *American Journal of physiology-regulatory interactive and comparative physiology*, 272, R350-R356, 1997.
- Spicer, J. I., Raffo, A. and Widdicombe, S.: Influence of CO₂-related seawater acidification on extracellular acid-base balance in the velvet swimming crab *Necora puber*. *Mar. Biol.*, 151, 1117-1125, 2007.
- Stegen, E. and Grieshaber, M. K.: Adenosine increases ventilation rate, cardiac performance and haemolymph velocity in the American lobster *Homarus americanus*, *J. Exp. Biol.*, 204, 947-957, 2001.
- Stillman, J. H. and Somero, G. N.: Adaptation to temperature stress and aerial exposure in congeneric species of intertidal porcelain crabs (genus *Petrolisthes*): Correlation of physiology, biochemistry and morphology with vertical distribution, *J. Exp. Biol.*, 199, 1845-1855, 1996.
- Svendsen, H., Borszczynska-Møller, A., Hagen, J. O., Lefauconnier, B., Tverberg, V., Gerland, S., Ørbæk, J. B., Bischof, K., Papucci, C., Zajackowski, M., Azzolini, R.,

- Bruland, O., Wiencke, C., winther, J.-G. and Dallmann, W.: The physical environment of Kongsfjorden-Krossfjorden, an Arctic fjord system in Svalbard, *Polar Res.*, 21,1,133-166, 2002.
- Truchot, J.-P.: Water carbonate alkalinity as a determinant of hemolymph acid-base balance in the shore crab, *Carcinus maenas*: a study at two different ambient PCO_2 and PO_2 levels, *J. Comp. Physiol. B*, 154, 601-606, 1984.
- Wickins, J. F.: The effect of hypercapnic sea water on growth and mineralization in penaeid prawns. *Aquaculture*, 41, 37-48, 1984.
- Wiltshire, K. H. and Manly, B. F. J.: The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: phytoplankton response, *Helgoland Mar. Res.*, 58, 269-273, 2004.
- Wittmann, A. C., Schröder, M., Bock, C., Steeger, H.-U., Paul, R. J., Pörtner, H.-O.: Indicators of oxygen- and capacity-limited thermal tolerance in the lugworm *Arenicola marina*, *Climate Res.*, 37, 227-240, 2008.
- Worden, M. K., Clark, C. M., Conaway, M. and Qadri, S. A.: Temperature dependence of cardiac performance in the lobster *Homarus americanus*, *J. Exp. Biol.*, 209, 1024-1034, 2006.
- Zainal, K. A. Y., Taylor, A. C. and Atkinson, R. J. A.: The effect of temperature and hypoxia on the respiratory physiology of the squat lobsters, *Munida rugosa* and *Munida sarsi* (Anomura, Galatheididae), *Comp. Biochem. Physiol.*, 101A, 557-567, 1992.

Figures

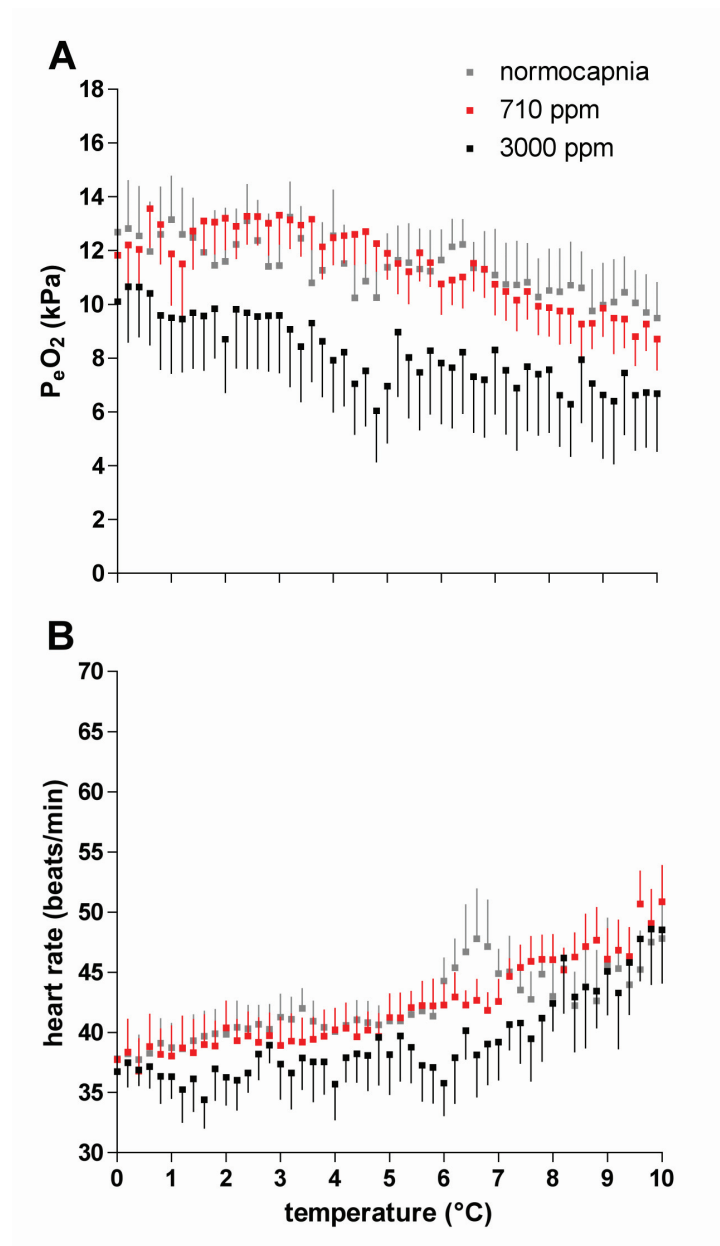


Fig. 1. Temperature dependent patterns of P_eO_2 and heart rate of *Hyas araneus* exposed to different CO_2 concentrations during acute cooling from 10 to 0°C (grey: normocapnia; red: 710 ppm; black: 3000 ppm). (a). P_eO_2 , values under 3000 ppm were significantly different from those under normocapnia and 710 ppm (ANOVA, $p < 0.001$). (b). Heart rate under 3000 ppm was significantly different from those under normocapnia and 710 ppm (ANOVA, $p < 0.001$). Data are means \pm SE, $n=7$ (normocapnia) and 8 (710 ppm, 3000 ppm), respectively.

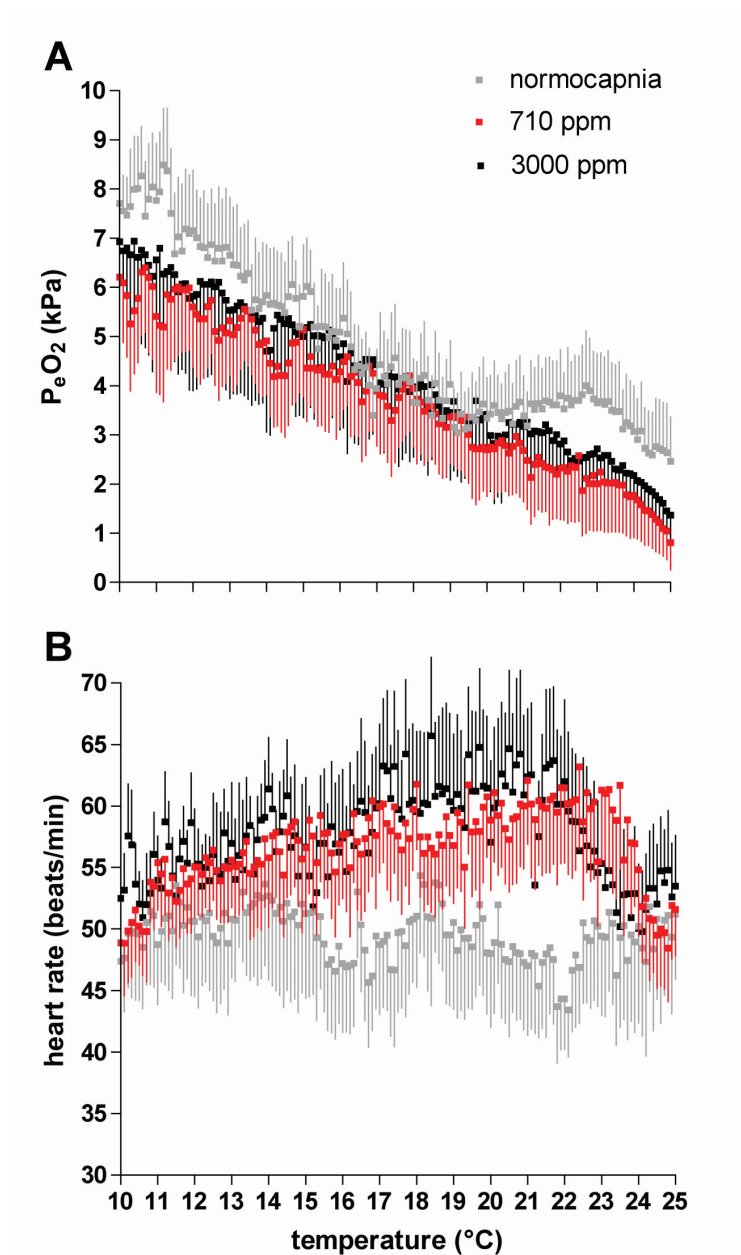


Fig. 2. Temperature dependent patterns of P_eO_2 and heart rate of *Hyas araneus* exposed to different CO_2 concentrations during acute warming from 10 to 25°C (grey: normocapnia; red: 710 ppm; black: 3000 ppm). (a). P_eO_2 values were significantly different between values under 3000 ppm and those under normocapnia and 710 ppm (ANOVA, $p < 0.01$) and between values under normocapnia and 710 ppm (ANOVA, $p < 0.01$). (b). Heart rate under normocapnia was significantly different from those under 710 ppm and 3000 ppm (ANOVA, $p < 0.001$). Data are means \pm SE, $n=7$ (normocapnia) and 8 (710 ppm, 3000 ppm).

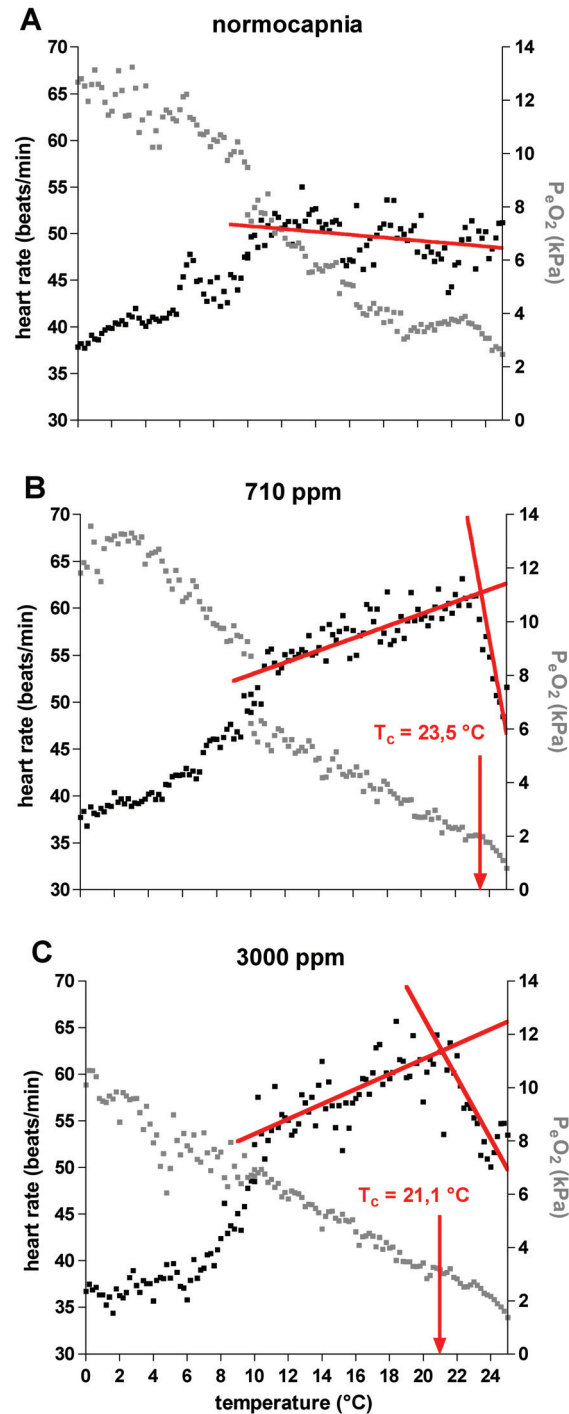


Fig. 3. Combined depiction of P_{eO_2} (black) and heart rate (grey) data (means) of *Hyas araneus* between 0 and 25°C (starting point 10°C). (a) normocapnia. (b) 710 ppm. (c) 3000 ppm. The red line indicates the shift in the upper T_c with rising CO_2 levels ($n=7$, normocapnia, $n=8$, 710 ppm and 3000 ppm). Discontinuities in the temperature dependence of heart rate data (means) between 10 and 25°C under normocapnia, 710 ppm CO_2 and 3000 ppm CO_2 , analysed from linear regressions intersecting at the respective breakpoints, defined as critical temperatures (T_c). Data under normocapnia revealed no breakpoint in the tested temperature range. Under 710 ppm, the T_c was 23.5°C, under 3000 ppm, the T_c was 21.1°C. Regressions under 710 ppm are: $f(10-23.5^\circ\text{C})=46.44+(0.6482\pm 0.01816)\bullet x$, $p<0.0001$, $f(23.5-25^\circ\text{C})=296.8+(-10\pm 0.7759)\bullet x$, $p<0.0001$. Regressions under 3000 ppm are: $f(10-21.1^\circ\text{C})=45.59+(0.8025\pm 0.031)\bullet x$, $p<0.0001$, $f(21.1-25^\circ\text{C})=131.5+(-3.27\pm 0.1852)\bullet x$, $p<0.0001$.

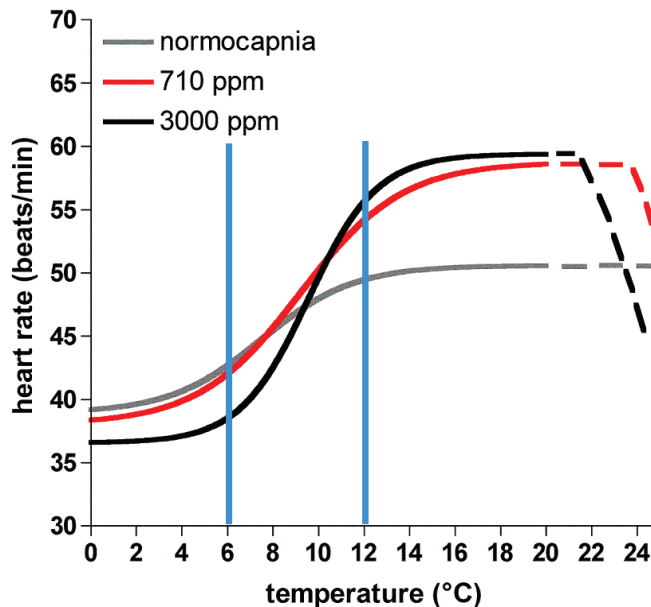


Fig. 4. Schematic model of heart rate in *Hyas araneus* under normocapnia (grey), 710 ppm (red) and 3000 ppm (black) CO₂ at temperatures between 0 and 25°C. Note the shift in thermal responses of heart rate, reflected in Q_{10} values, calculated from the exponential phases between 6 and 12°C (blue bars). Q_{10} values were larger under 3000 ppm ($Q_{10}=2.05$) than under 710 ppm ($Q_{10}=1.55$) or normocapnia ($Q_{10}=1.25$). As a result, onset of a drop in heart rate and upper critical temperature were seen at lower temperatures under 3000 than under 710 ppm. Heart rate under normocapnia showed no warming induced decrement. Non-linear regression fit with Boltzmann sigmoidal equation for normocapnia: $y=38.92+(50.60-38.92)/(1+\exp((7.502-x)/2.014))$; $r^2=0.8429$, for 710 ppm: $y=38.04+(58.76-38.04)/(1+\exp((9.201-x)/2.235))$; $r^2=0.9757$, for 3000 ppm: $y=36.57+(59.40-36.57)/(1+\exp((9.566-x)/1.506))$; $r^2=0.9531$.

Publikation II

Effects of ocean acidification and warming on the larval development of the spider crab *Hyas araneus* from different latitudes (54° vs. 79°N)

K Walther, K Anger, HO Pörtner

2010

Marine Ecology Progress Series

(akzeptiert)

Marine Ecology Progress Series, 2010

**Effects of ocean acidification and warming on the
larval development of the spider crab *Hyas araneus*
from different latitudes (54° vs. 79°N)**

Kathleen Walther^{1*}, Klaus Anger², Hans O. Pörtner¹

¹Alfred-Wegener-Institute for Polar and Marine Research, Department Integrative Ecophysiology,
Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven, Germany

²Biologische Anstalt Helgoland, Alfred-Wegener-Institute for Polar and Marine Research, Ostkaje
1118, 27498 Helgoland, Germany

*Email: Kathleen.Walther@awi.de

ABSTRACT: The combined impacts of future scenarios of ocean acidification and global warming on the larvae of a cold-eurythermal spider crab, *Hyas araneus* L., were investigated in one of its southernmost populations (living around Helgoland, southern North Sea, 54°N) and one of the northernmost populations (Svalbard, North Atlantic, 79°N). Larvae were exposed at temperatures of 3, 9 and 15°C to present day normocapnia (380 ppm CO₂) and to CO₂ conditions expected for the near or medium-term future (710 ppm by 2100 and 3000 ppm CO₂ by 2300 and beyond). Larval development time and biochemical composition were studied in the larval stages Zoea I, II, and Megalopa. Permanent differences in instar duration between both populations were detected in all stages, likely as a result of evolutionary temperature adaptation. With the exception of Zoea II at 3°C and under all CO₂ conditions, development in all instars from Svalbard was delayed compared to those from Helgoland, under all conditions. Most prominently, development was much longer and fewer specimens morphosed to the first crab instar in the Megalopa from Svalbard than from Helgoland. Enhanced CO₂ levels (710 and particularly 3000 ppm), caused extended duration of larval development and reduced larval growth (measured as dry mass) and fitness (decreasing C/N ratio, a proxy of the lipid content). Such effects were strongest in the zoeal stages in Svalbard larvae, and during the Megalopa instar in Helgoland larvae.

KEY WORDS: Ocean acidification · CO₂ · Larval development · CHN · Growth · Helgoland · Svalbard

INTRODUCTION

The ongoing increase of anthropogenic CO₂ in the atmosphere causes an accumulation of CO₂ in the oceans and an acidification trend, which develops in parallel with global warming (IPCC 2001, 2007). Caldeira and Wickett (2005) calculated scenarios of CO₂ concentrations in the atmosphere and ocean according to various emission scenarios. They predicted a CO₂ concentration of 710 ppm in the atmosphere and oceans by the year 2100; values of about 3000 ppm CO₂ might be reached by the year 2300 (Caldeira & Wickett 2005). CO₂ is absorbed into the ocean surface water by air-to-sea equilibration and will be distributed by ocean circulation (Orr et al. 2001). The associated trends of ocean acidification lead to questions about their impact on marine ecosystems in times of oceans warming (cf. Pörtner et al. 2005, Pörtner 2008).

Studies on adult crustaceans have detected negative effects of CO₂ on various physiological processes and performances (*Chionoectes tanneri*: Pane & Barry 2007, *Cancer pagurus*: Metzger et al. 2007, *Necora puber*: Spicer et al. 2007, *Palaemon pacificus*: Kurihara et al. 2008, *Semibalanus balanoides*: Findlay et al. 2009, *Hyas araneus*: Walther et al. 2009). An important time window in any marine ecosystem is defined by the early development of animals, which is the basis for a successful life cycle (Fabry et al. 2008). However, little information exists on the effect of enhanced CO₂ levels in combination with global warming on the physiology of early developmental stages of invertebrates, especially of crustaceans. Existing studies have focused on echinoderms (Dupont et al. 2008, Kurihara 2008), copepods (Kurihara et al. 2004, Mayer et al. 2007), lobsters (Arnold et al. 2009) and barnacles (Findlay et al. 2009) and have demonstrated negative effects of CO₂ on development, morphology, growth, hatching success or survival of early developmental stages. Furthermore, sensitivity to CO₂ may be highest where a species experiences extreme temperatures (Pörtner & Farrell 2008) and lives close to the border of its temperature dependent distribution range, e.g. along a latitudinal gradient.

The spider crab *Hyas araneus* (L.) is a cold-eurythermal species and seems to be a good model organism for such studies, because it shows a particularly wide geographic range. In the eastern North Atlantic, it is distributed from the temperate southern North Sea (near Helgoland, 54°N, Germany) to the sub-Arctic waters of Svalbard (79°N, Norway) (Christiansen 1969). The temperature in the southern North Sea varies

seasonally between 3°C and 18°C (Wiltshire & Manly 2004). Near Svalbard, by contrast, the temperatures range from 0°C to 6°C (Svendsen et al. 2002). Adult individuals live on stony, sandy and soft bottoms from <1 m down to 360 m, most commonly at depths less than 50 m (Christiansen 1969). The ovigerous females release their larvae upon hatching of the first zoeal stage after a two-year embryonic development period (Petersen 1995). The rate at which the Zoea I moults to the Zoea II is temperature-dependent. The zoeal stages are larger than in other decapods (Anger 2001) and use thoracopods (maxillipeds I and II) to swim in the water column (Christiansen 1971). After the moult to the Megalopa stage, they assume a semi-benthic life style, selecting a suitable habitat for the benthic juvenile and adult life-history stages, before they metamorphose to the first crab instar (Anger 2001).

Growth and biochemical composition during the period of larval development appear as suitable indicators to study the combined effects of temperature and ocean acidification (Anger 1998, Anger 2001). It is well known that these traits are influenced by temperature (Anger 1987, Anger 2001), but little is known about specific or additional effects of CO₂. A study on lobster larvae showed a negative effect of CO₂ on their dry mass (Arnold et al. 2009). Previous studies on the larval biology of *Hyas araneus* have used individuals from the temperate region of Helgoland (Anger & Nair 1979, Anger 1983, Anger 1987) or from the region around Oslo (Christiansen 1971), while no data have been available from the sub-Arctic region of Svalbard. In the present study, we investigated, whether populations of *Hyas araneus* from the southern temperate and northern cold limits of distribution, respectively, differ in their characteristics of temperature adaptation and in their responses to elevated CO₂ levels.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining and maintaining live materials from Helgoland and Svalbard.

Ovigerous females (15 individuals) of *Hyas araneus* were dredged in January 2008 at 30 to 50m depth near Helgoland (German Bight, North Sea, 54° 11'N, 7° 53'O) (Fig. 1). Each female was kept in a flow-through aquarium at ambient water temperature (4 - 6°C) and salinity (32‰) at the Biologische Anstalt Helgoland (Alfred-Wegener-Institute, Germany). Experiments were performed with larvae from three females that hatched from the end of January to the end of February 2008.

In July 2008, ovigerous females (60 individuals) of *Hyas araneus* were caught by divers in the Kongsfjorden (Svalbard, Norway, 78° 55'N, 11° 57'O) (Fig. 1). Females were transported to the Alfred-Wegener-Institute, Bremerhaven (Germany) and kept for 8 months at 5°C and 32‰ salinity in flow-through seawater aquaria. Before larvae hatched, the females were transported to the Helgoland Marine Station (Biologische Anstalt Helgoland, AWI). Here the larvae hatched during the period from the end of February to the beginning of April 2009. For the experiments larvae from four females were used.

Due to extended periods of reproduction, the number of females contributing to sufficient numbers of offspring was small, the first three females from Helgoland and the first four females from Svalbard. From each female, a total of 1350 freshly hatched larvae were used in the experiments. Per combination of treatments (3 temperatures, 3 CO₂ conditions), each 50 larvae from a single female (three from Helgoland; four from Svalbard in total) were distributed over seven 0.5-L Kautex-flasks (7 x 50 larvae per female x 9 treatments). Every day the seawater was changed, dead larvae removed and larvae were fed with freshly hatched *Artemia* sp. Nauplii (50 - 100 food individuals per ml) (San Francisco, Bay Brand).

Zoea I-larvae from the 7 flasks of each female and treatment that moulted to the next instar Zoea II on the same day were pooled together into a new flask. When up to 12 animals moulted into Zoea II, they were transferred into 0.2-L Kautex flasks. When more than 12 and up to 30 individuals moulted, we used 0.5-L Kautex flasks. After moulting from Zoea II to the Megalopa instar, we pooled the Megalopa of each female and treatment in 0.2-L Kautex flasks (1 to 5 individuals) and 0.5-L Kautex flasks (6 to 15 individuals). Exposure of megalopae at 9 and 15°C continued until metamorphosis to the crab I stage occurred. In this way, not only the duration of larval development was recorded, but also the survival rate of the megalopae prior to metamorphosis into the crab I stage. At 3°C, megalopae were reared only till the 14th day, because of extended development.

Treatments. Larvae were reared at three different temperatures (3, 9 and 15°C) in combination with three CO₂ conditions (normocapnia (= 380 ppm CO₂), 710 ppm and 3000 ppm). For normocapnic conditions, seawater filtered at 0.2 µm was used. For a CO₂ concentration of 710 ppm, 60-L Kautex bottles were filled with filtered seawater and equilibrated with a gas mixture (0.071% carbon dioxide, 21% oxygen in nitrogen). For exposure under 3000 ppm, a gas mixture (0.3% carbon dioxide, 21% oxygen in

nitrogen, provided by AIRLIQUID) was used. The flasks were closed with a lid, to avoid contamination with air and to ensure stable water conditions over 24 hours. Each day the seawater was changed, Kautex bottles were refilled, and pH was measured (WTW 340i, WTW SenTix HWS). Alkalinity samples were taken, fixed with a HgCl₂ solution (0.02%), and stored at 3°C in 250-mL borosilicate flasks. Total alkalinity was later measured by potentiometric titration (Brewer et al. 1986) and calculated from linear Gran Plots. The carbonate system was calculated from temperature, pH, alkalinity and salinity using the CO2Sys program (Lewis & Wallace 1998) using equilibrium constants provided by Mehrbach et al. (1973) and refitted by Dickson and Millero (1987). The parameters of the carbonate system applied during the various treatments are given in Table 1.

CHN analysis. All larval stages were subjected to biochemical analyses. Five replicate samples were collected from each treatment after hatching of the Zoea I (with four larvae per replicate), after moulting to the Zoea II (two larvae per replicate), and in the Megalopa (one larva per replicate) within a few hours after moulting (day 0, denoted as M0), on day 7 (M7), and day 14 (M14). Larvae were briefly rinsed in Millipore water, blotted on filter paper, and stored frozen at -20°C in pre-weighted tin cartridges. The samples were freeze-dried over night (CHRIST freeze-dryer ALPHA 1-4 LSC). After determination of the dry weight to the nearest 0.1µg on a Sartorius SC2 microbalance, carbon (C) and nitrogen (N) were measured in a C-H-N analyzer (Elementar Vario MICRO CUBE).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism (Version 4, GraphPad Software Inc.) and STATISTICA (Cersion 7.1, StatSoft Inc.). Prior to the analyses, the data were tested for female-specific effects, as larvae from individual females were grouped throughout the experimental period. For this reason we used a one-way ANOVA with females as factor levels. Where assumptions for normality and homogeneity of variances were not met, a Kruskal-Wallis test was conducted. The results showed that there were differences between individual females from Helgoland and also, between individuals from Svalbard. Accordingly, it cannot be excluded that the results are biased by individual geno- and phaenotypes. Although the comparison of data from larvae originating from individual females showed significant differences between females, actual values were very similar between females from one region. Accordingly, we assume that differences between individuals do not obscure the differences between regions and climate regimes.

The duration of larval development in Zoea I and II was analysed with respect to the factors temperature, CO₂ condition and population using three-way ANOVAs. Dry weight and C/N ratios were analysed using four-way ANOVAs testing the effects of the factors temperature, CO₂ condition, population and developmental stage. In all tested data sets, assumptions of normal distribution of data were met. Inspections of quantile-plots indicated no obvious deviations from normality, although Bartlett's test of homogeneity of variances indicated clear deviations from this assumption in all data sets ($P < 0.05$) also when transformed. We nonetheless chose to use the parametric ANOVAs. According to Underwood (1997 cited in Coleman et al. 2006), large designs incorporating three or more factors are robust against the consequences of deviation from this assumption.

In case of significant results, subsequent pairwise comparisons were made using Tukey post hoc tests in order to identify the differences. The analysis of the survival of the Megalopa and the metamorphosis to the first crab instar were tested by Pearson's Chi-square-test. Graphs were designed with GraphPad Prism (version 4.). Average values of the development data are given as arithmetic means \pm 1 SD. Values of dry weight and C/N are given as means \pm 1 SD. All analyses were tested at the 0.95 % confidence level.

RESULTS

Development and survival

The larval development of *Hyas araneus* through the instars Zoea I and II depends on temperature and CO₂ concentration (Fig. 2). The analysis revealed that the duration of the first instar (Zoea I) lasted longer in individuals from Svalbard than from Helgoland, that temperature had a significant effect on the duration of development and that increased CO₂ levels caused increased development times (for all three main factors $p < 0.001$; Table 2). Overall, the lengths of developmental periods of larvae originating from different populations and exposed to different CO₂ levels responded differently to temperature (interactions population*temperature and temperature*CO₂ with $p < 0.01$ each; Table 2).

In actual fact, under all CO₂ conditions, the Zoea I larvae from Svalbard (north) developed significantly slower at 3°C (61.4 – 66.8 d) and 9°C (20 – 20.9 d) than the larvae from Helgoland (south) (3°C: 46.9 - 50 d, 9°C: 16.8 – 17.4 d) ($p < 0.05$) (Fig. 2a, Table 3). At 15°C, the difference between the Helgoland (10.5 d) and Svalbard population (13.8 d) was significant only at 3000 ppm CO₂, with a longer development in the Svalbard larvae ($p < 0.05$). The development of the Zoea I at 3°C was in both populations significantly slower at 3000 ppm compared to normocapnia (380 ppm CO₂) or 710 ppm CO₂ ($p < 0.05$).

The analyses of the duration of the second instar (Zoea II) revealed significances for all factors and factor combinations apart from population*CO₂ (Table 2). The results indicate, that the developmental duration of Zoea II from individuals originating from Svalbard and Helgoland, was differently affected by temperature and CO₂ levels. Only at 3°C the duration of the Zoea II instar differed significantly between populations and CO₂ conditions (Fig. 2b, $p < 0.001$, Table 3). In contrast to the pattern seen in the other larval stages, development was significantly slower in the Zoea II from Helgoland (south) (72.5 – 75.8 d) than in the Svalbard (north) larvae (59.3 – 69 d) ($p < 0.001$). Svalbard Zoea II reared under 3000 ppm developed significantly more slowly (69 d) than larvae reared under normocapnia (59.3 d) and 710 ppm (62.9 d) ($p < 0.001$).

The survival and duration of the development of the Megalopa and their metamorphosis to the first crab instar showed significant differences between Helgoland larvae reared at 3000 ppm CO₂ and those reared under the other CO₂ conditions, at 9°C (Fig. 3, $p < 0.05$, Table 3). Under 3000 ppm, the development time of the Megalopa stage (49.1 d) was extended, and significantly fewer Megalopa moulted to the crab I stage (8 out of 357 individuals) compared to those under normocapnia (41 d, 67 out of 312 individuals) and 710 ppm (42 d, 73 out of 279 individuals) ($p < 0.001$). Differences between Helgoland (south) and Svalbard (north) larvae in the survival and development time of the Megalopa stage were found under all CO₂ conditions. In Svalbard larvae under all conditions the duration of Megalopa development was significantly extended compared to larvae from Helgoland, at 9 °C ($p < 0.05$). Metamorphosis to the first crab instar occurred after about 30 days (normocapnia) in the Helgoland (south) population, in contrast to 40 days (normocapnia) in the larvae from Svalbard (north) ($p < 0.05$). In the Svalbard Megalopa, no differences in development time could be identified between the various CO₂ conditions. The number of crab I juveniles obtained from Svalbard megalopae was similar and, when compared to those from Helgoland,

generally low under normocapnia (3 out of 252 individuals), at 710 ppm (3 out of 172), and at 3000 ppm (none out of 120). By comparison, 8 to 73 individuals (less at higher CO₂ levels, see above) developed successfully to the crab I stage in the population from Helgoland.

At 15°C (Fig. 3, Table 3) Megalopa survival, development time and metamorphosis to the crab I stage showed a pattern similar to the one at 9°C. The survival rate of the Megalopa from Helgoland was significantly less under 710 ppm than under normocapnia; development took significantly longer under 3000 ppm (30.1 d) than under both normocapnia (26.8 d) and 710 ppm (26.7 d) ($p < 0.05$). Significant differences between populations could be identified in the survival of the Megalopa under all CO₂ conditions and in the success of metamorphosis under normocapnia and 710 ppm. Similar to observations at 9°C, only few larvae (1 out of 145 individuals at normocapnia, 2 out of 224 at 710 ppm, and 2 out of 140 at 3000 ppm) moulted to the first crab instar in the Svalbard (northern) population. In contrast, 79 out of 335 individuals (normocapnia), 65 out of 224 (710 ppm) and 38 out of 281 (3000 ppm) developed successfully in the Helgoland (southern) population.

The cumulative duration of larval development is shown in Figure 4. Under all CO₂ conditions total larval development of the Svalbard larvae was prolonged at 9 and 15°C, with a further extension under 3000 ppm as compared to the other CO₂ treatments. The longest Zoea phase was found in larvae from Svalbard (north) incubated at 3000 ppm.

Growth and elemental composition

The analyses of biomass (dry weight in µg/Ind.) revealed significances for all factors and factor combinations apart from the interactions of all four factors (Table 2). The results indicate, that dry weights of individuals originating from Svalbard and Helgoland were differently affected by temperature and CO₂ levels and that this was different between the two developmental stages under study (see interactions of three factors, Table 2).

Dry weight increased from the Zoea I to the Zoea II and throughout the Megalopa stage (M0 - M7 - M14; Fig. 5a). At 3°C, no differences were detectable between populations. At 9°C, the dry weight of Helgoland (southern) larvae increased significantly during the Megalopa instar (from M0 to M14) whereas it did not in the

Svalbard (northern) larvae, which grew much more slowly ($p < 0.001$, Table 3). In both populations the differences between dry weights of Megalopa at 7 d and 14 d were highly significant ($p < 0.001$). Larvae reared at 15°C showed a similar picture. The increment in dry weight of larvae from Helgoland was significantly larger from Megalopa at 0 d to 7 d and 14 d compared to the Svalbard population ($p < 0.001$).

The analyses revealed further that all factors affected the C/N ratios significantly (for all main factors $p < 0.001$; Table 2). Although not all interactions between two or three factors were significant, the results indicate that the C/N ratios of individuals originating from Svalbard and Helgoland were affected differently by temperature and CO₂ levels and that this was different between the two developmental stages under study (p for interaction of all four factors < 0.01 ; Table 2). The C/N ratio at all temperatures showed an increase from Zoea I (3.86) to Zoea II (about 5.0) (Fig. 5b). During the Megalopa instar the C/N ratio was nearly constant, except at 9°C, when the values in the Megalopa from Helgoland measured at 7d (5.38) and 14 d (5.45) increased slightly and those in the Svalbard megalopae (M7: 4.72; M14: 4.61) decreased significantly ($p < 0.05$).

At 3 and 9°C, dry weight of the Helgoland (southern) Megalopa at 7 d and 14 d was significantly lower under 3000 ppm CO₂ as compared to normocapnia and 710 ppm (Fig. 6a, $p < 0.01$, Table 3). At 15°C, dry weight of the Megalopa at 7 d was only significantly lower at 3000 ppm CO₂ compared to normocapnia and 710 ppm ($p < 0.01$). A significant difference between C/N ratios measured at the three CO₂ conditions was seen in Megalopa 14 d at 9°C, being lower at 3000 ppm (4.55) than under normocapnia (5.45) and 710 ppm (4.96) ($p < 0.001$). For the Svalbard (northern) population no significant differences in the C/N ratio could be identified between the various CO₂ conditions.

DISCUSSION

Population comparison

The ovigerous females of the Helgoland (southern) population released their larvae in mid-winter, from late January to late February. This differs from the hatching period

observed about 30 years ago, which occurred later, mainly from mid-February to mid-March (Anger & Nair 1979, Anger 1986). The cause of this shift in phenology might be an increase in the average winter temperature in the southern North Sea from 2° to 4°C (Wiltshire & Manly 2004). In *Hyas araneus*, the seasonal warming in late winter and spring seems to be a trigger for hatching. It relates to the onset of the plankton bloom, and hence, an increasing food supply to the larvae (Starr et al. 1994, Anger 2001). This trigger may now occur earlier during winter, ending the diapause in its two-year embryonic development (Petersen 1995). Similar strategies of a biennial reproductive cycle, which is connected to seasonal plankton blooms, have also been observed in other decapods from high latitudes, for example *Chionoecetes opilio* (Taylor et al. 1985) and *Paralithodes platypus* (Jensen & Armstrong 1989).

In the Svalbard (northern) population, the ovigerous females release their larvae between late February and early April, which coincides with the beginning of the spring plankton bloom in the Arctic region (Hop et al. 2002). Again, this appears to be adaptive, as all larval stages of *Hyas araneus* depend on food supply. As an alternative developmental strategy, other crustaceans at high latitudes pass through a lecithotrophic (i.e. food-independent) larval phase (Anger et al. 2003). This has been observed, for instance, in Lithodidae from sub-Arctic and Antarctic waters (*Lithodes maja*, *L. santolla*, *Paralomis granulosa*), which may release their larvae throughout the year, independent of seasonal plankton blooms (Anger 1996, Thatje et al. 2003).

The larval development of *H. araneus* in all stages is generally temperature-dependent, with a shortening at increasing temperature, similar to other crabs (e.g. Nakanishi 1981, Okamoto 1993, Vinuesa et al. 1985, Anger et al. 2003). Larvae from Helgoland (south) and Svalbard (north) differ significantly in the duration of development at the same temperature and within the same stage (Fig. 2, 3). With only one exception (Zoea II at 3°C), duration was longer in the larvae from Svalbard. This extended development in the Svalbard population may be indicative of a trend towards permanent cold adaptation in the Arctic population. Enhanced energy efficiency seen in polar stenotherms is realized at the expense of extended rates of reproduction and development (cf. Pörtner 2006). This elevated energy efficiency is associated with the narrow temperature range that the species experiences during embryonic development in the North (0 - 6°C; Svendsen et al. 2002), compared to the wider temperature range experienced in the South (3 - 18°C; Wiltshire and Mainly 2004). Studies on *Jasus edwardsii* (Smith et al. 2002) and *Rhithropanopeus harrisi* (Laughlin and French 1989)

illustrated the correlative effect of temperature on embryonic and larval development periods. Thus, two-years of cold temperature presumably cause a reduction of embryonic development, with the consequence of an extended larval developmental period, as necessary for the formation of body compartments.

The larval development of *Hyas araneus* begins after hatching during the coldest time of the year in January to March at Helgoland (south) (Anger & Nair 1979, Anger 1983). The Zoea II is found in April to May, when temperatures are increasing to about 9°C, and the Megalopa develops from May to July at temperatures up to ca. 16°C. The zoeal stages of *Hyas araneus* may thus be pre-adapted to low temperatures, while the Megalopa should prefer warmer conditions.

The Megalopa instar changes from a pelagic to a semi-benthic phase. During this time the megalopae select a suitable habitat where they settle and later metamorphose to the first crab instar (Anger & Dawirs 1982, Anger 1983, Sulkin 1984). The delayed development of the Svalbard (northern) megalopae may enhance their sensitivity to variability in the physical conditions and exposes them for longer periods to potential predators in their pelagic phase (Morgan 1995). Higher mortality observed in the Svalbard Megalopa at 9 and 15°C and in the Helgoland population at temperatures >15°C may indicate heat stress, which disturbs the enzymatic or hormonal systems that regulate the moult cycle (Anger 1987).

Differences in development periods between Helgoland (southern) and Svalbard (northern) larvae concur with different growth rates (Anger 1987, Anger 2001). During the development of each instar, dry weight and the C/N ratio showed an increase during the postmoult phase and a decrease during premoult (Anger 1987, Anger et al. 1989), which coincides with patterns of lipid storage (Anger & Hirche 1990), mainly in the hepatopancreas (Storch & Anger 1983). The C/N ratio is a proxy for the lipid to protein ratio, reflecting the fitness of the larvae (Anger 2001). Dry weight and C/N ratio are higher in Helgoland larvae compared to those from Svalbard, in particular during the Megalopa instar (Fig. 5). This is reflected in higher carbon values (unpublished data), higher C/N ratios, and higher lipid contents, thus indicating a higher fitness level. Anger et al. (1983) found similar levels of dry weight in *Hyas araneus* larvae from Helgoland reared at 12°C, 9 or 15°C. However, the C/N values reported by Anger et al. (1983) were much lower than in our material from Helgoland (south), but similar to those from Svalbard (north). Hence, it seems that larvae from Helgoland reared at 9 - 15°C now have a higher lipid content than about 20 years ago. This suggests an improved

adaptation of the Helgoland population at temperatures up to 16°C, which might enhance their tolerance to changes associated with global warming (Anger 1983, Wiltshire & Manly 2004).

Low levels of dry weight and C/N ratio in megalopae reared at 3°C (for both populations) reflect a lower tolerance of the Megalopa to very low temperatures (Fig. 5). Our data indicate that this temperature is low also for Svalbard (northern) megalopae, where the temperature reaches up to 6°C in summer (Svendsen et al. 2002). Svalbard megalopae are thus experiencing temperatures between 3 and 6°C. This is a narrower range than around Helgoland (south), where the larvae experience 9 - 15°C (Fig. 5). The level of temperature adaptation in each larval stage may be genetically pre-determined, comparable with the genetic pre-adaptation to different salinities observed in crab larvae (Charmantier 1998, Anger & Charmantier 2000, Charmantier et al. 2002).

The metamorphosis of the Megalopa from Svalbard to the first crab instar is disturbed by temperatures above 9°C. Global warming may therefore cause reduced survival or migrations of sub-Arctic populations towards colder regions, for instance to the northeast of Greenland (Christiansen 1982). This region is influenced by the extremely cold East Greenland Current, which apparently excludes an occurrence of brachyuran crabs (Christiansen 1982). Warming in the North Atlantic may thus create new habitats for the cold-adapted population of *Hyas araneus* in Arctic regions. Its long planktonic phase ("long-distance larvae"; Thorson 1961) supports dispersal over a wide geographic range. Our study indicates that the populations from Helgoland and Svalbard show different levels of temperature adaptation, raising the question whether these populations are also genetically distinct. Molecular studies are currently underway in our group to address this question.

CO₂ effects

The Zoea I and the Megalopa of the Helgoland population were most severely affected under 3000 ppm CO₂ (Figs. 2, 3, 6). In Svalbard larvae, enhanced CO₂ levels extended the duration of the zoeal stages (Fig. 2). However, in Svalbard Megalopa, delayed developmental time was primarily induced by increased temperature (Fig. 3), which was confirmed by the observation that CO₂ caused no differences in dry weight and C/N ratio (data not shown). Upon closer inspection of the total period of larval

development, the prolonging effect of 3000 ppm CO₂ on the cumulative period of larval development is conspicuous (Fig. 4). This developmental delay implies extended exposure to predators in the pelagic environment.

A CO₂ level of 710 ppm showed no significant effects on the developmental parameters studied (Figs. 2, 3, 6). The question arises, whether a threshold concentration exists above which larval development and growth in this species are disturbed. Arnold et al. (2009) demonstrated a decrease in the dry weight of larval lobsters (*Homarus gammarus*) exposed to 1200 ppm CO₂, but no differences were detected in the period of planktonic development. Presumably, CO₂ first affects larval growth, before the duration of development is extended. This is in line with our data, where a trend for dry weight and C/N ratio to decrease was detectable at 710 ppm CO₂ (Fig. 6).

CO₂ diffuses into the larval body, where it acidifies the haemolymph and other compartments (Pörtner et al. 2004). It may thereby interfere with enzymatic or hormonal systems, which are essential for the moulting cycle (Anger 1987). This may be due to the pH-dependence of enzymatic processes and the dependence of hormonal mechanisms on enzyme activities. Prior to moulting, larval metabolism appears to switch from lipid storage to an increasing production of protein (enzymes and structural proteins relevant during moulting), which is reflected in decreasing C/N ratios (Anger 1987, Anger et al. 1989, Anger 2001). CO₂ might affect these metabolic processes, e.g. through metabolic depression (Pörtner et al. 2004). It may thereby reduce the C/N ratios and dry weights (Fig. 6). Lower dry weight might also indicate a thinner and less calcified exoskeleton (Arnold et al. 2009), causing greater susceptibility to predators and disease.

Conclusions

The discussion above suggests that the Megalopa stage of *Hyas araneus* is more warm adapted and has a narrower thermal window than its two zoeal stages, so that this larval instar may be a bottleneck in the life cycle. This putative pattern is schematically illustrated in Figure 7. In the Helgoland population, ocean acidification should affect larval growth (dry weight) and physiological condition (C/N ratio; Fig. 6). The Svalbard population, by contrast, seems to respond more sensibly to thermal stress than to

enhanced CO₂ levels, evidenced by the thermal disturbance of development during the Megalopa stage (Fig. 3) and no differences in fitness related data (dry weight and C/N ratio) under elevated CO₂ levels (data not shown). Further during ontogeny, we may expect that the thermal tolerance window is narrower in the spawner (i.e. the ovigerous females) than in males and non-ovigerous females (cf. Pörtner & Farrell, 2008). This hypothesis is supported by observations of ovigerous females that drop their eggs within a few days when they are kept at 18°C (Kunisch & Anger 1984). This projection results from the principles of oxygen and capacity limited thermal tolerance: The brooding of the egg masses by crustacean females (Fernández et al. 2000, Wheatly 1981) enhances oxygen demand at constant oxygen supply capacity and, thereby, exacerbates any oxygen limitation. This conclusion is supported by the observation that spawners increase their oxygen consumption rate during the embryonic development (Baeza and Fernández 2002) and especially during warming (Wheatly 1981).

Furthermore, elevated CO₂ causes a narrowing of the thermal tolerance window in adult *Hyas araneus*, illustrated by a shift of the critical temperature from above 25°C to 21°C under 3000 ppm CO₂ (Walther et al. 2009). At ecosystem level, this narrowing of the thermal tolerance window of *Hyas araneus* by increasing CO₂ concentrations will thus primarily affect ovigerous females and the Megalopa (Fig. 3, Fig. 6). In conclusion, ocean warming and acidification endanger the recruitment of the benthic life stages of the species. The warming of the North Sea by 1.1°C during the last 40 years (Wiltshire and Manly 2004), already led to a drastic decrease in the abundance of *Hyas araneus* around Helgoland. Additionally, the southernmost distribution limit, which Christiansen (1969) saw in the English channel, might have shifted north accordingly (Fig. 1). Ongoing ocean acidification trends may exacerbate this trend and shift this limit further and even north of Helgoland (54°N).

Acknowledgements. This work is a contribution to the "European Project on Ocean Adification" (EPOCA) which received funding from the European Community's Seventh Framework programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 211384. EPOCA is endorsed by the International Programme LOICZ. Further support was received from the PACES research program of the Alfred-Wegener-Institute and the BIOACID program of the Federal Ministry of Research, Germany. We would like to thank Karin Boos, Pauline Dierichsweiler, Julia Haafke, Jan N. Knott, Bettina

Oppermann, Stefanie Schnell, Karoline Schreiber, Lena Weber and Graeme Moss for excellent technical assistance.

LITERATURE CITED

- Anger K, Nair KKC (1979) Laboratory experiments on the larval development of *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). Helgol Meeresunters 32:36-54
- Anger K, Dawirs RR (1982) Elemental composition (C,N,H) and energy in growing and starving larvae of *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). Fish Bull 80:419-433
- Anger K (1983) Temperature and the larval development of *Hyas araneus* L. (Decapoda: Majidae); extrapolation of laboratory data to field conditions. J Exp Mar Biol Ecol 69: 203-215
- Anger K, Laasch N, Püschel C, Schorn F (1983) Changes in biomass and chemical composition of spider crab (*Hyas araneus*) larvae reared in the laboratory. Mar Ecol Prog Ser 12:91-101
- Anger K (1986) Changes of respiration and biomass of spider crab (*Hyas araneus*) larvae during starvation. Marine Biology 90:261-269
- Anger K (1987) Energetics of spider crab *Hyas araneus* megalopa in relation to temperature and the moult cycle. Mar Ecol Prog Ser 36:115-122
- Anger K, Harms J, Püschel C, Seeger B (1989) Physiological and biochemical changes during the larval development of a brachyuran crab reared under constant conditions in the laboratory. Helgoländer Meeresunters 43:225-244
- Anger K, Hirche H-J (1990) Nucleic acids and growth of larval and early juvenile spider crab, *Hyas araneus*. Mar Biol 105:403-411
- Anger K (1996) Physiological and biochemical changes during lecithotrophic larval development and early juvenile growth in the northern stone crab, *Lithodes maja* (Decapoda: Anomura). Mar Biol 126:283-296
- Anger K (1998) Patterns of growth and chemical composition in decapod crustacean larvae. Invertebr Repr Dev 33:159-176
- Anger K, Charmantier G (2000) Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in a mangrove crab, *Sesarma curacaoense* (Decapods: Grapsidae). J Exp Mar Biol Ecol 251:265-274

- Anger K (2001) The biology of decapod crustacean larvae. Crustacean Issue 14. A.A. Balkema Publishers, Swets and Zeitlinger, Lisse, p 1-420
- Anger K, Thatje S, Lovrich G, Calcagno J (2003) Larval and early juvenile development of *Paralomis granulosa* reared at different temperatures: tolerance of cold and food limitation in a lithodid crab from high latitudes. Mar Ecol Prog Ser 253:243-251
- Arnold KE, Findlay HS, Spicer JO, Daniels CL, Boothroyd D (2009) Effect of CO₂-related acidification on aspects of the larval development of the European lobster, *Homarus gammarus* (L.). Biogeosciences 6:1747-1754
- Baeza JA, Fernández M (2002) Active brood care in *Cancer setosus* (Crustacea: Decapoda): the relationship between female behaviour, embryo oxygen consumption and the cost of brooding. Funct Ecol 16:241-251
- Brewer PG, Bradshaw AL, Williams RT (1986) Measurement of total carbon dioxide and alkalinity in the North Atlantic Ocean in 1981. In: Trabalka, J.R., Reichle, D.E. (ed) The Changing Carbon Cycle - a Global Analysis. Springer. New York: p 358-381
- Caldeira K, Wickett M E (2005) Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. J Geophys Res 110: C09S04, doi:10.1029/2004JC002671
- Charmantier G (1998) Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. Invertebr Reprod Dev 33:177-190
- Charmantier G, Giménez L, Charmantier-Daures M, Anger K (2002) Ontogeny of osmoregulation, physiological plasticity, and larval export strategy in the grapsid crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda). Mar Ecol Prog Ser 229:185-194
- Christiansen ME (ed) (1969) Crustacea Decapoda Brachyura. In: Marine Invertebrates of Scandinavia. No. 2, Universitetsforlaget, Oslo
- Christiansen ME (1971) Larval development of *Hyas araneus* (Linnaeus) with and without antibiotics (Decapoda, Brachyura, Majidae). Crustaceana 21:307-315
- Christiansen ME (1982) A review of the distribution of Crustacea Decapoda Brachyura in the northeast Atlantic. Quad Lab Tecnol Pesca 3:34-354
- Coleman RA, Underwood AJ, Benedetti-Cecchi L, Åberg P, Arenas F, Arrontes J, Castro J, Hartnoll RG, Jenkins SR, Paula J, Della Santina P, Hawkins SJ (2006) A continental scale evaluation of the role of limpet grazing on rocky shores.

- Oecologia 147:556-564
- Dickson AG, Millero FJ (1987) A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Res* 34:1733-1743
- Dupont S, Havenhand J, Thorndyke W, Peck L, Thorndyke M (2008) Near-future level of CO₂-driven ocean acidification radically affects larval survival and development in the brittlestar *Ophiothrix fragilis*. *Mar Ecol Prog Ser* 373:285-294
- Fabry VJ, Seibel BA, Feely RA, Orr JC (2008) Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES J Mar Sci* 65:414-432
- Fernández M, Bock C, Pörtner HO (2000) The cost of being a caring mother: the ignored factor in the reproduction of marine invertebrates. *Ecol Lett* 3:487-494
- Findlay HS, Kendall MA, Spicer JI, Widdicombe S (2009) Future high CO₂ in the intertidal may comprise adult barnacle *Semibalanus balanoides* survival and embryonic development rate. *Mar Ecol Prog Ser* 389:193-202
- Hop H, Pearson T, Hegseth EN, Kovacs KM, Wiencke C, Kwasniewski S, Eiane K, Mehlum F, Gulliksen B, Wlodarska-Kowalczyk M, Lydersen C, Weslawski JM, Cochrane S, Gabrielsen GW, Leakey RJG, Lønne OJ, Zajaczkowski M, Falk-Petersen S, Kendall M, Wängberg S-Å, Bischof K, Voronkov AY, Kovaltchouk NA, Wiktor J, Poltermann M, di Prisco G, Papucci C, Gerland S (2002) The marine ecosystem of Kongsfjorden, Svalbard. *Polar Res* 21:167-208
- IPCC (2001) *Climate Change 2001, Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge
- IPCC (2007) *Climate Change 2007, Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge
- Jensen GC, Armstrong DA (1989) Biennial reproductive cycle of blue king crab, *Paralithodes platypus*, at the Pribilof Island, Alaska and comparison to a congener, *P. camtschatica*. *Can J Fish Aquat Sci* 46:932-940
- Kunisch M, Anger K (1984) Variation in development and growth rates of larval and juvenile spider crabs *Hyas araneus* reared in the laboratory. *Mar Ecol Prog Ser* 15:293-301
- Kurihara H, Shimode S, Shirayama Y (2004) Effects of raised CO₂ concentration on the egg production rate and early development of two marine copepods (*Arctica steueri* and *Acartia erythraea*). *Mar Poll Bull* 49:721-727

- Kurihara H (2008) Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Mar Ecol Prog Ser* 373:275-284
- Kurihara H, Matsui M, Furukawa H, Hayashi M, Ishimatso A (2008) Long-term effects of predicted future seawater CO₂ conditions on the survival and growth of the marine shrimp *Palaemon pacificus*. *J Exp Mar Biol Ecol* 367:41-46
- Laughlin RB, French W (1989) Interactions between temperature and salinity during brooding on subsequent zoeal development of the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*. *Mar Biol* 102:377-386
- Lewis E, Wallace DWR (1998) Program developed for CO₂ system calculations. ORNL/CDIAC-105. Carbon Dioxide Information Analysis Center. Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy
- Mayer DJ, Matthews C, Cook K, Zuur AF, Hay S (2007) CO₂-induced acidification affects hatching success in *Calanus finmarchicus*. *Mar Ecol Prog Ser* 350:91-97
- Mehrbach C, Culberson C, Hawley J, Pytkovicz R (1973) Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnol Oceanogr* 18:897-907
- Metzger R, Sartoris FJ, Langenbuch M, Pörtner HO (2007) Influence of elevated CO₂ concentrations on thermal tolerance of the edible crab *Cancer pagurus*. *J Therm Biol* 32:144-151
- Morgan SG (1995) Life and death in the plankton: larval mortality and adaptation. In: McEdward, L.R. (Ed.), *Ecology of Marine Invertebrate Larvae*. CRC Press, Boca Raton, p 279–321
- Nakanishi T (1981) The effect of temperature on growth, survival and oxygen consumption of larvae and post-larvae of *Paralithodes brevipes* (Decapoda: Anomura). *Bull Jap Sea Reg Fish Res Lab* 32:49-56
- Okamoto K (1993) Influence of temperature on survival and growth of larvae of the giant spider crab *Macrocheira kaempferi* (Crustacea, Decapoda, Majidae). *Nippon Suisan Gakkaishi* 59:419-424
- Orr JC, Maier-Reimer E, Mikolajewicz U, Monfray P, Samiento JL, Toggweiler JR, Taylor NK, Palmer J, Gruber N, Sabine CL, Le Quéré C, Key RM, Boutin J (2001) Estimates of anthropogenic carbon uptake from four three-dimensional global ocean models. *Global Biogeochem Cy* 15:43-60
- Pane EF, Barry JP (2007) Extracellular acid-base regulation during short-term hypercapnia is effective in a shallow-water crab, but ineffective in a deep-sea

- crab. *Mar Ecol Prog Ser* 334:1-9
- Petersen S (1995) The embryonic development of *Hyas araneus* L. (Decapoda, Majidae): effects of temperature. *Sarsia* 80:193-198
- Pörtner HO, Langenbuch M, Reipschläger A (2004) Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *J Oceanography* 60:705-718
- Pörtner HO, Langenbuch M, Michaelidis B (2005) Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: From Earth history to global change. *J Geophys Res* 110: C09S10, doi:10.1029/2004JC002561
- Pörtner HO (2006) Climate-dependent evolution of Antarctic ectotherms: an integrative analysis. *Deep-Sea Res* 53:1071-1104
- Pörtner HO (2008) Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar Ecol Prog Ser* 373:203-217
- Pörtner HO, Farrell AP (2008) Physiology and climate change. *Science* 322 (5902): 690-692, doi: 10.1126/science.1163156
- Smith GG, Ritar AJ, Thompson PA, Dunstan GA, Brown MR (2002) The effect of embryo incubation temperature on indicators of larval viability in Stage I phyllosoma of the spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture* 209:157-167
- Spicer JJ, Raffo A, Widdicombe S (2007) Influence of CO₂-related seawater acidification on extracellular acid-base balance in the velvet swimming crab *Necora puber*. *Mar Biol* 151:1117-1125
- Starr M, Therriault J-C, Conan GY, Comeau M, Robichaud G (1994) Larval release in a sub-euphotic zone invertebrate triggered by sinking phytoplankton particles. *J Plankton Res* 16:1137-1147
- Storch V, Anger K (1983) Influence of starvation and feeding on the hepatopancreas of larval *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). *Helgol Meeresunters* 36:67-75
- Sulkin SD (1984) Behavioral basis of depth regulation in the larvae of brachyuran crabs. *Mar Ecol Prog Ser* 15:181-205
- Svendsen H, Breszczyńska-Møller A, Hagen JO, Lefauconnier B, Tverberg V, Gerland S, Ørbæk JB, Bischof K, Papucci C, Zajaczkowski M, Azzolini R, Bruland O, Wiencke C, Winther J-G, Dallmann W (2002) The physical environment of Kongsfjorden-Krossfjorden, an Arctic fjord system in Svalbard. *Polar Res* 21:133-166
- Taylor DM, Hooper RG, Ennis GP (1985) Biological aspects of the spring breeding

- migration of snow crabs, *Chionoecetes opilio*, in Bonne Bay, Newfoundland (Canada). Fish B-Noaa 83:707-711
- Thatje S, Calcagno JA, Lovrich GA, Sartoris FJ, Anger K (2003) Extended hatching periods in the subantarctic lithodid crabs *Lithodes santolla* and *Paralomis granulosa* (Crustacea: decapoda: Lithodidae). Helgol Mar Res 57:110-113
- Thorson G (1961) Length of pelagic larval life in marine bottom invertebrates as related to larval transport by ocean currents. Pubs Am Ass Advmt Sci 67:455-474
- Underwood AJ (1997) Experiments in ecology. Their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge, University Press
- Vinuesa JH, Ferrari L, Lombardo RJ (1985) Effect of temperature and salinity on larval development of southern king crab (*Lithodes antarcticus*). Mar Biol 85:83-87
- Walther K, Sartoris FJ, Bock C, Pörtner HO (2009) Impact of anthropogenic ocean acidification on thermal tolerance of the spider crab *Hyas araneus*. Biogeosciences 6: 2207-2215
- Wheatly MG (1981) The provision of oxygen to developing eggs by female shore crabs (*Carcinus maenas*). J Mar Biol Ass UK 61:117-128
- Wiltshire KH, Manly BFJ (2004) The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: phytoplankton response. Helgol Mar Res 58:269-273

Table 1. Parameters of the seawater carbonate system calculated from temperature, pH, total alkalinity (TA) and salinity (32‰) using the CO2Sys program (Lewis & Wallace 1998). Mean values \pm SD (N = 10)

| Temperature (°C) | treatment | pH | TA ($\mu\text{mol/kg}$) | PCO_2 (μatm) |
|------------------|-----------------------|-----------------|---------------------------|------------------------------------|
| 3 | Normocapnia (380 ppm) | 8.11 \pm 0.05 | 2405 \pm 7 | 354 \pm 65 |
| | 710 ppm | 7.81 \pm 0.03 | 2405 \pm 4 | 754 \pm 37 |
| | 3000 ppm | 7.33 \pm 0.03 | 2405 \pm 6 | 2378 \pm 164 |
| 9 | Normocapnia (380 ppm) | 8.12 \pm 0.07 | 2404 \pm 8 | 346 \pm 80 |
| | 710 ppm | 7.81 \pm 0.03 | 2403 \pm 6 | 786 \pm 54 |
| | 3000 ppm | 7.35 \pm 0.04 | 2406 \pm 8 | 2443 \pm 238 |
| 15 | Normocapnia (380 ppm) | 8.05 \pm 0.04 | 2409 \pm 2 | 401 \pm 30 |
| | 710 ppm | 7.79 \pm 0.04 | 2409 \pm 4 | 846 \pm 42 |
| | 3000 ppm | 7.34 \pm 0.04 | 2409 \pm 2 | 2637 \pm 160 |

Table 2. *Hyas araneus*. Results of the three-way ANOVAs concerning development duration of Zoea I and II and the four-way ANOVAs concerning dry weight and C/N ratio.

| Source of variation | df | SS | MS | F | P |
|--|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| <i>Development duration of Zoea I</i> | | | | | |
| Population | 1 | 2951.1 | 2951.1 | 656.03 | <0.001 |
| Temperature | 2 | 81978.5 | 40989.3 | 9111.81 | <0.001 |
| CO ₂ | 2 | 163.5 | 81.8 | 18.17 | <0.001 |
| Population*Temperature | 2 | 2061.3 | 1030.7 | 229.11 | <0.001 |
| Population*CO ₂ | 2 | 16.8 | 8.4 | 1.87 | 0.16 |
| Temperature*CO ₂ | 4 | 97.9 | 24.5 | 5.44 | <0.001 |
| Population*Temperature*CO ₂ | 4 | 12.6 | 3.2 | 0.70 | 0.59 |
| Residuals | 198 | 890.7 | 4.5 | | |
| <i>Development duration of Zoea II</i> | | | | | |
| Population | 1 | 247.0 | 247.0 | 31.05 | <0.001 |
| Temperature | 2 | 134227.4 | 67113.7 | 8438.24 | <0.001 |
| CO ₂ | 2 | 208.7 | 104.3 | 13.12 | <0.001 |
| Population*Temperature | 2 | 1737.9 | 868.9 | 109.25 | <0.001 |
| Population*CO ₂ | 2 | 30.1 | 15.0 | 1.89 | 0.15 |
| Temperature*CO ₂ | 4 | 335.1 | 83.8 | 10.53 | <0.001 |
| Population*Temperature*CO ₂ | 4 | 111.4 | 27.8 | 3.50 | <0.01 |
| Residuals | 198 | 1574.8 | 8.0 | | |
| <i>Dry weight (µg/Ind.)</i> | | | | | |
| Stage | 3 | 7646605 | 2548868 | 635.60 | <0.001 |
| Population | 1 | 461772 | 461772 | 115.15 | <0.001 |
| Temperature | 2 | 576620 | 288310 | 71.89 | <0.001 |
| CO ₂ | 2 | 402686 | 201343 | 50.21 | <0.001 |
| Stage*Population | 3 | 405112 | 135037 | 33.67 | <0.001 |
| Stage*Temperature | 6 | 500121 | 83353 | 20.79 | <0.001 |
| Population*Temperature | 2 | 652833 | 326417 | 81.40 | <0.001 |
| Stage*CO ₂ | 6 | 327346 | 54558 | 13.60 | <0.001 |
| Population*CO ₂ | 2 | 75106 | 37553 | 9.36 | <0.001 |
| Temperature*CO ₂ | 4 | 60944 | 15236 | 3.80 | <0.01 |
| Stage*Population*Temperature | 6 | 148187 | 24698 | 6.16 | <0.001 |
| Stage*Population*CO ₂ | 6 | 106149 | 17692 | 4.41 | <0.001 |
| Stage*Temperature*CO ₂ | 12 | 169639 | 14137 | 3.53 | <0.001 |
| Population*Temperature*CO ₂ | 4 | 43176 | 10794 | 2.69 | <0.05 |
| 1*2*3*4 | 12 | 75578 | 6298 | 1.57 | 0.09 |
| Residues | 908 | 3641237 | 4010 | | |
| <i>C/N ratio</i> | | | | | |
| Stage | 3 | 14.89 | 4.96 | 40.9 | <0.001 |
| Population | 1 | 16.39 | 16.39 | 135.1 | <0.001 |
| Temperature | 2 | 39.18 | 19.59 | 161.5 | <0.001 |
| CO ₂ | 2 | 2.56 | 1.28 | 10.6 | <0.001 |
| Stage*Population | 3 | 2.79 | 0.93 | 7.7 | <0.001 |
| Stage*Temperature | 6 | 27.57 | 4.60 | 37.9 | <0.001 |
| Population*Temperature | 2 | 0.21 | 0.11 | 0.9 | 0.42 |
| Stage*CO ₂ | 6 | 2.67 | 0.44 | 3.7 | <0.01 |
| Population*CO ₂ | 2 | 0.76 | 0.38 | 3.1 | <0.05 |
| Temperature*CO ₂ | 4 | 0.93 | 0.23 | 1.9 | 0.10 |
| Stage*Population*Temperature | 6 | 2.57 | 0.43 | 3.5 | <0.01 |
| Stage*Population*CO ₂ | 6 | 1.44 | 0.24 | 2.0 | 0.07 |
| Stage*Temperature*CO ₂ | 12 | 1.79 | 0.15 | 1.2 | 0.26 |
| Population*Temperature*CO ₂ | 4 | 2.63 | 0.66 | 5.4 | <0.001 |
| 1*2*3*4 | 12 | 3.78 | 0.32 | 2.6 | <0.01 |
| Residues | 906 | 109.87 | 0.12 | | |

Table 3. *Hyas araneus*. Significant results from pairwise comparisons (Tukey post-hoc tests) focusing on differences, which had all been identified as significant in preceding ANOVAs and Chi-square tests. Statistical significances in development, dry weight and C/N ratios between three different temperatures (3, 9, 15°C) and instars (Zoea I, ZI; Zoea II, ZII; Megalopa 0 d (M0), 7 d (M7), 14 d (M14)); comparison between populations from Helgoland and Svalbard and between different CO₂ conditions (Normocapnia, 710 ppm, 3000 ppm)

| Comparison | | <i>p</i> – values |
|--|----------------------|---|
| Development duration of Zoea I (three-way ANOVA) | | |
| 3°C | Helgoland - Svalbard | Normocapnia 710 ppm <i>p</i> = 0.000036 |
| | | 3000 ppm <i>p</i> = 0.000036 |
| 3°C | Helgoland | Normocapnia - 3000 ppm <i>p</i> = 0.033092 |
| | | 710 ppm - 3000 ppm <i>p</i> = 0.27101 |
| 3°C | Svalbard | Normocapnia - 3000 ppm 710 ppm - 3000 ppm <i>p</i> = 0.000036 |
| | | <i>p</i> = 0.047041 |
| 9°C | Helgoland - Svalbard | Normocapnia 710 ppm 3000 ppm <i>p</i> = 0.031423 <i>p</i> = 0.001099 <i>p</i> = 0.005142 |
| 15°C | Helgoland - Svalbard | 3000 ppm <i>p</i> = 0.018803 |
| Development duration of Zoea II (three-way ANOVA) | | |
| 3°C | Helgoland - Svalbard | Normocapnia 710 ppm 3000 ppm <i>p</i> = 0.000036 <i>p</i> = 0.000036 <i>p</i> = 0.000036 |
| 3°C | Svalbard | Normocapnia - 3000 ppm 710 ppm - 3000 ppm <i>p</i> = 0.000047 <i>p</i> = 0.000036 |
| Survival of Megalopa (Chi-square-test) | | |
| 9°C | Helgoland - Svalbard | Normocapnia 710 ppm 3000 ppm <i>p</i> = 0.0004 <i>p</i> = 0.0138 <i>p</i> < 0.0001 |
| 9°C | Helgoland | Normocapnia - 3000 ppm 710 ppm - 3000 ppm <i>p</i> < 0.0001 <i>p</i> < 0.0001 |
| 15°C | Helgoland - Svalbard | Normocapnia 710 ppm 3000 ppm <i>p</i> < 0.0001 <i>p</i> < 0.0001 <i>p</i> = 0.0485 |
| 15°C | Helgoland | Normocapnia - 710 ppm <i>p</i> = 0.0139 |
| | Svalbard | Normocapnia - 3000 ppm 710 ppm - 3000 ppm <i>p</i> = 0.0006 <i>p</i> = 0.0218 |
| Metamorphosis to crab 1 (Chi-square-test) | | |
| 9°C | Helgoland - Svalbard | Normocapnia 710 ppm <i>p</i> = 0.0093 <i>p</i> = 0.0002 |
| 9°C | Helgoland | Normocapnia - 3000 ppm 710 ppm - 3000 ppm <i>p</i> < 0.0001 <i>p</i> < 0.0001 |
| 15°C | Helgoland - Svalbard | Normocapnia 710 ppm <i>p</i> = 0.0207 <i>p</i> = 0.0094 |
| 15°C | Helgoland | Normocapnia - 3000 ppm 710 - 3000 ppm <i>p</i> < 0.0001 <i>p</i> < 0.0001 |
| Dry weight (µg/Ind.) at Normocapnia (four-way ANOVA) | | |
| 9°C | Helgoland - Svalbard | M7 M14 <i>p</i> = 0.000031 <i>p</i> = 0.000031 |
| 15°C | Helgoland - Svalbard | M0 M7 M14 <i>p</i> = 0.000717 <i>p</i> = 0.000098 <i>p</i> = 0.000041 |
| Dry weight (µg/Ind.) of Helgoland larvae (four-way ANOVA) | | |
| 3°C | M7 | Normocapnia - 3000 ppm <i>p</i> = 0.009827 |
| | M14 | Normocapnia - 3000 ppm 710 ppm - 3000 ppm <i>p</i> = 0.00205 <i>p</i> = 0.000035 |
| 9°C | M7 | Normocapnia - 3000 ppm 710 ppm - 3000 ppm <i>p</i> = 0.000031 <i>p</i> = 0.002273 |
| | M14 | Normocapnia - 3000 ppm 710 ppm - 3000 ppm <i>p</i> = 0.000031 <i>p</i> = 0.004209 |
| 15°C | M7 | Normocapnia - 3000 ppm 710 ppm - 3000 ppm <i>p</i> = 0.003527 <i>p</i> = 0.000031 |
| C/N ratio at Normocapnia (four-way ANOVA) | | |
| 9°C | Helgoland - Svalbard | M7 M14 <i>p</i> = 0.005616 <i>p</i> = 0.000186 |
| C/N ratio of Helgoland larvae (four-way ANOVA) | | |
| 9°C | M14 | Normocapnia - 3000 ppm <i>p</i> = 0.000051 |

Figures

Fig. 1. Distribution of *Hyas araneus* in the North Atlantic modified after Christiansen (1969), The map shows the original distribution range from the English channel (dashed lines) to the Arctic (Svalbard, 79°N) (black lines) and the present, postulated distribution from German Bight (Helgoland, 54°N) till Svalbard (black lines).

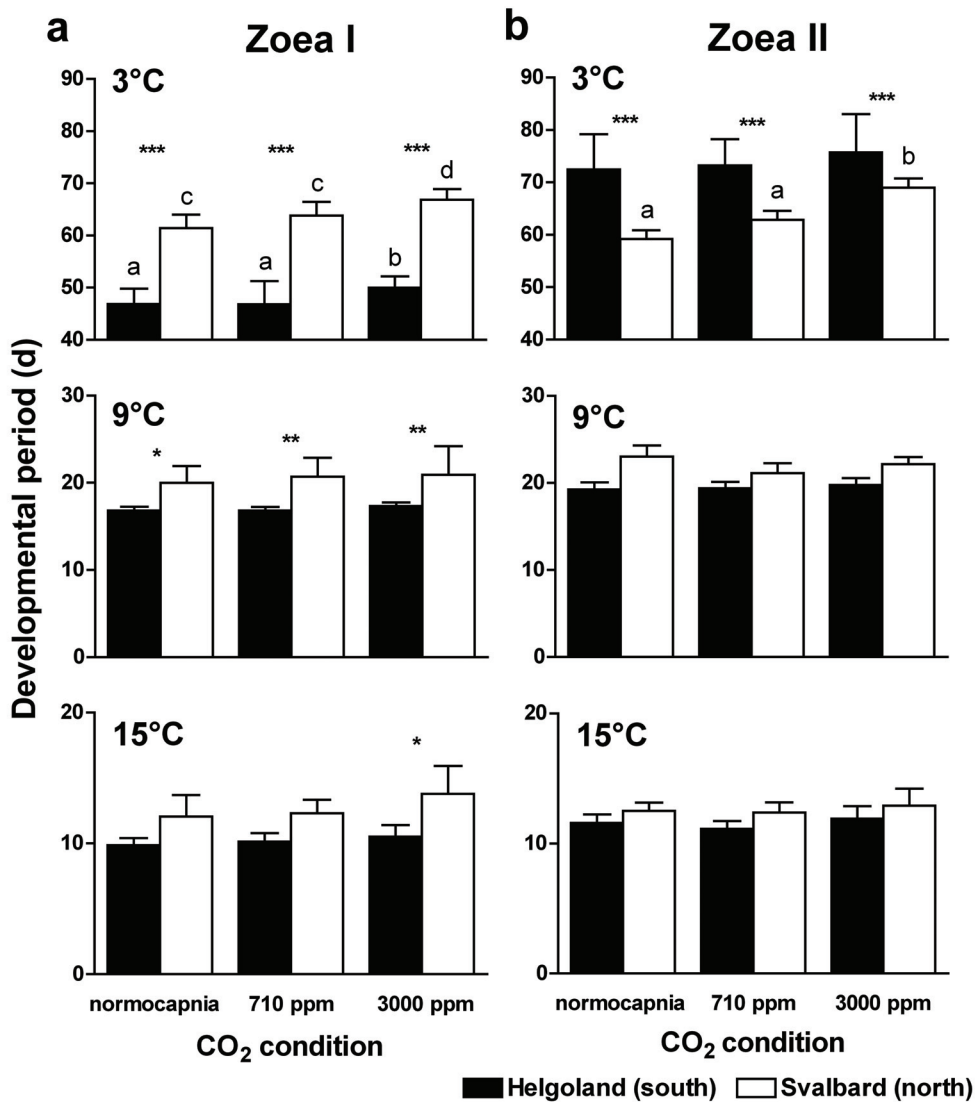


Fig. 2. *Hyas araneus*, comparison of two populations (Helgoland (south), H, black; Svalbard (north), S, white). Larval development through zoeal stages I and II reared from hatching at 3, 9 and 15°C and under different CO₂ conditions (normocapnia, N; 710 ppm; 3000 ppm). (a) Zoea I (N = 479-980), significant differences between populations (* asterisks) detected at each temperature; (b) Zoea II (N = 104-662), significant differences between populations at 3°C only; significant differences between different CO₂ conditions (normocapnia, N; 710 ppm; 3000 ppm) within a population (small types) at 3°C only. Four-way ANOVA, *p*-values in Table 3.

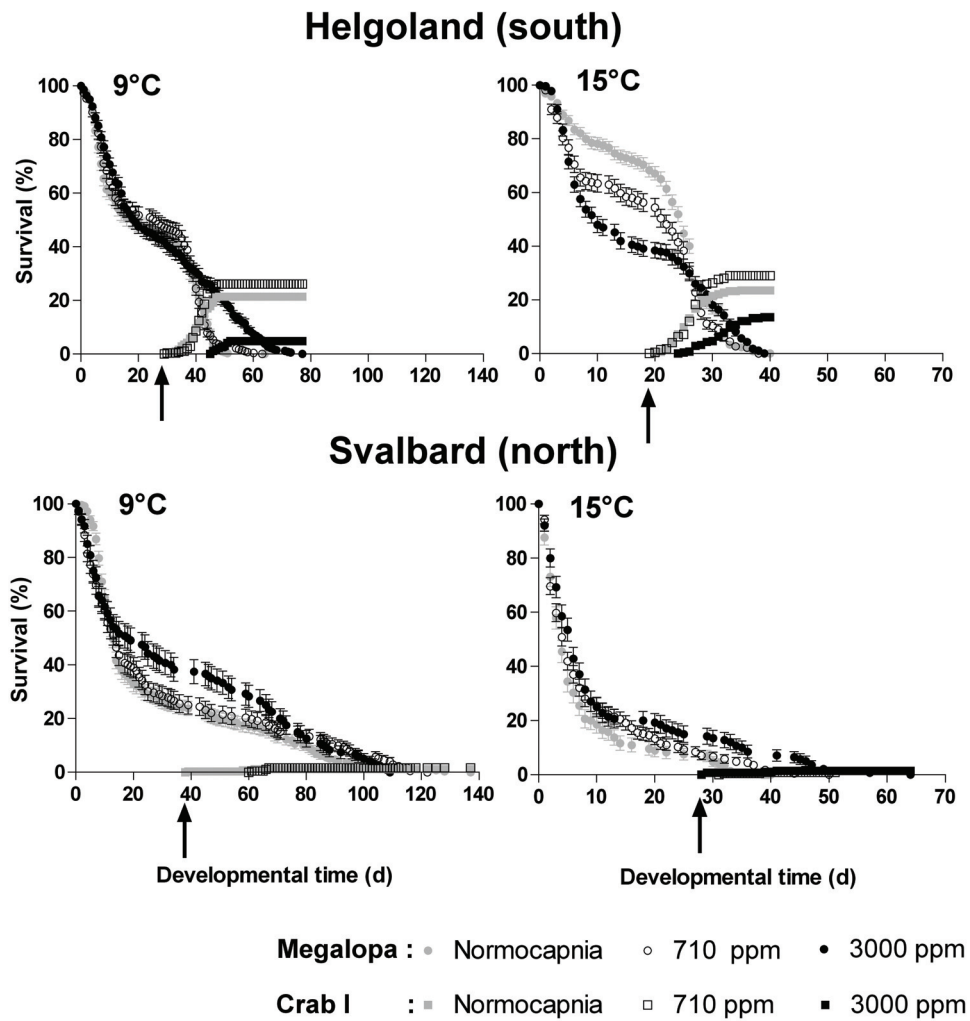


Fig. 3. *Hyas araneus*, comparison of two populations (Helgoland (south), Svalbard (north)). Survival through Megalopa stage and moulting to crab I, reared from hatching under normocapnia (grey), 710 ppm (unfilled black) and 3000 ppm (filled black) CO₂, at 9 and at 15°C. Symbols depict mean percent survival values ± SE (initial N = 120-367). Arrows indicate the initiation of metamorphosis of megalopae to crab I. Chi-squared test, *p*-values in Table 3.

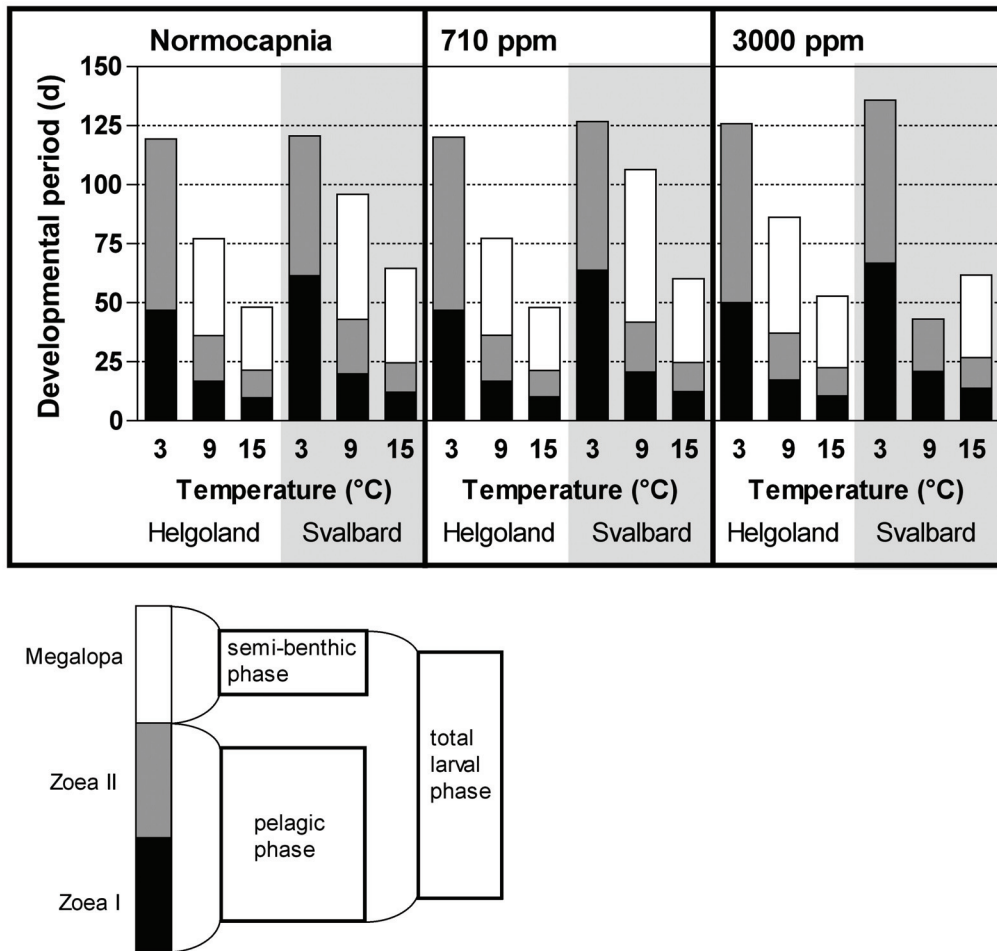


Fig. 4. *Hyas araneus*, comparison of two populations (Helgoland (south), white background; Svalbard (north), light-grey background). Cumulative duration of larval development under normocapnia, 710 ppm, and 3000 ppm CO₂ and at 3, 9 and 15°C. Zoa I (black) and II (dark-grey) represent the fully pelagic larval phases; the Megalopa (white) (not recorded for 3°C) is semi-benthic.

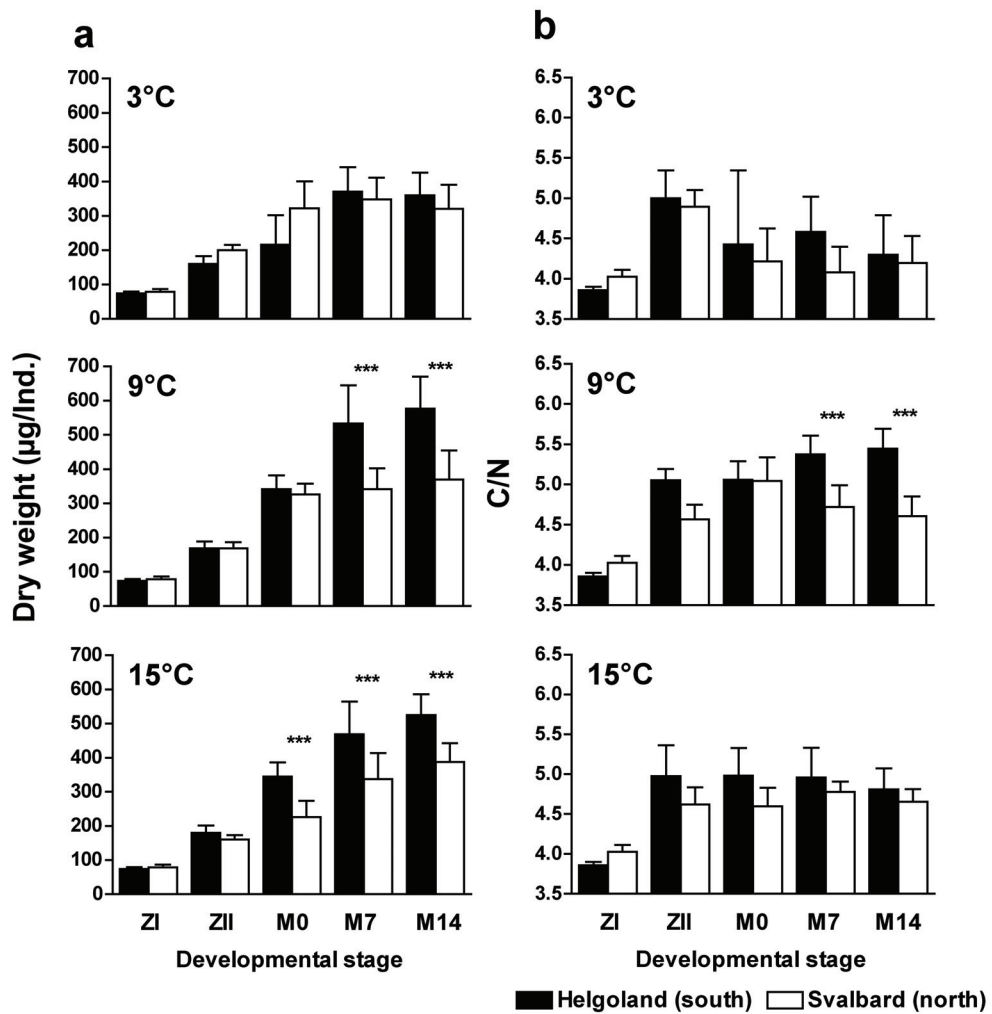


Fig. 5. *Hyas araneus*, comparison of two populations (Helgoland (south), Svalbard (north)). Dry weight (a) and C/N ratio (b) of zoal stages I (ZI), II (ZII), Megalopa 0 d (M0), 7 d (M7) and 14 d (M14) reared at 3, 9 and 15°C under normocapnia. Significant differences in dry weight at 9 and 15°C and in the C/N ratio at 9°C. Four-way ANOVA, N = 10, *p*-values in Table 2.

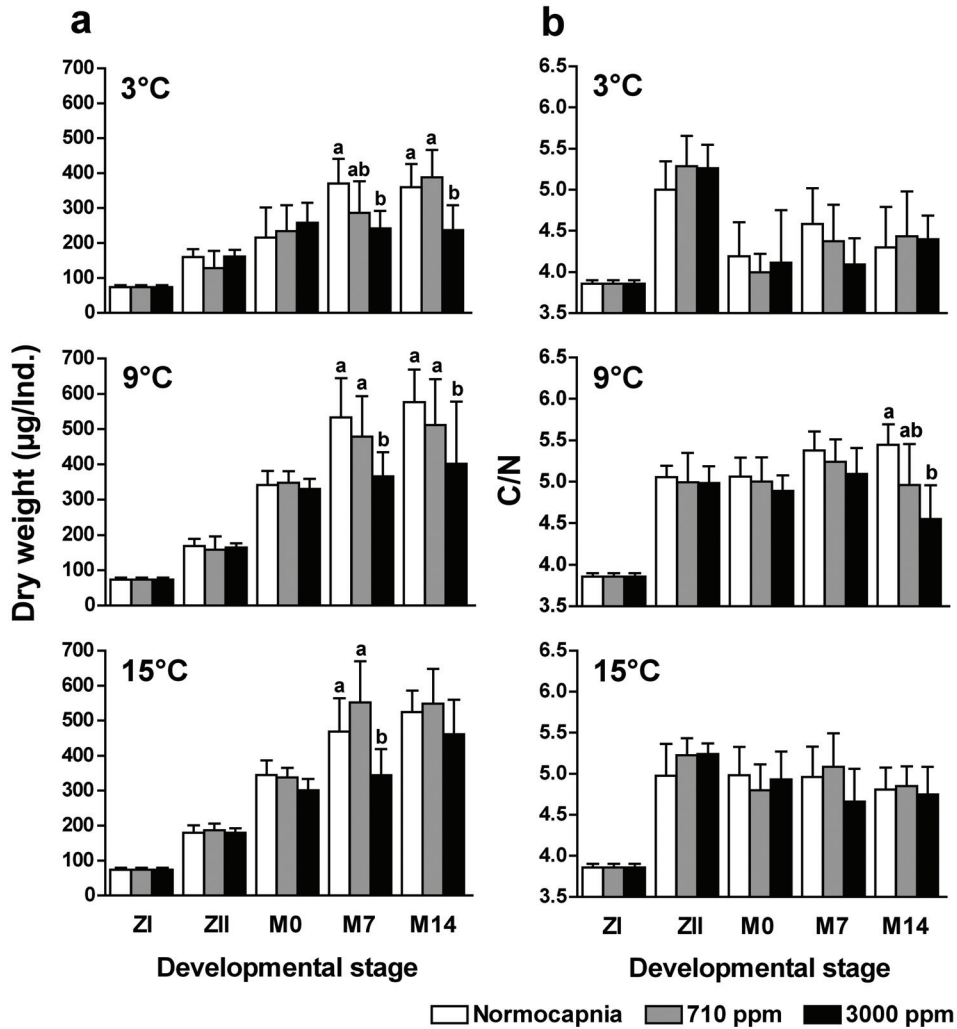


Fig. 6. *Hyas araneus*. Dry weight (a) and C/N ratio (b) of zoeal stages I (ZI), II (ZII), Megalopa 0 d (M0), 7 d (M7) and 14 d (M14) in Helgoland larvae reared at 3, 9 and 15°C under normocapnia (white), 710 ppm CO₂ (grey) and 3000 ppm CO₂ (black). Significant differences between different CO₂ condition within each developmental time (small type): 4-way ANOVA, N = 10, *p*-values in Table 2.

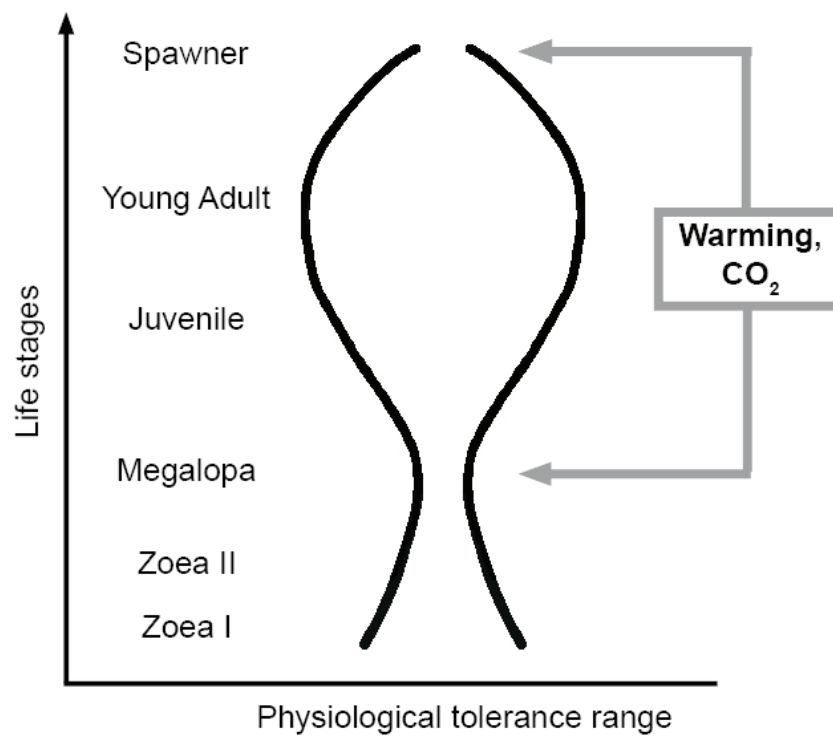


Fig. 7. *Hyas araneus*. Schematic model of ontogenetic changes in the physiological tolerance range. Warming and CO₂ primarily affect the Megalopa stage and adult spawners.

Publikation III

Impacts of ocean warming and acidification on larval calcification of the spider crab *Hyas araneus* (L.) from different latitudes (54 ° vs 79 °N)

K Walther, FJ Sartoris, HO Pörtner

2010

Marine Biology

(eingereicht)

Marine Biology, eingereicht

Impacts of ocean warming and acidification on larval calcification of the spider crab *Hyas araneus* (L.) from different latitudes (54° vs 79°N)

Kathleen Walther · Franz J. Sartoris · Hans O. Pörtner

K Walther · F. J. Sartoris · H. O. Pörtner
Alfred-Wegener-Institute for Polar and Marine Research,
Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven, Germany

Corresponding to:

e-mail: Kathleen.Walther@awi.de

telephone: +49(471)48312197

fax: +49(471)48311149

Abstract The combined effects of ocean warming and acidification were compared in larvae from two populations of the cold-eurythermal spider crab *Hyas araneus*, one of its southernmost populations (around Helgoland, southern North Sea, 54°N, habitat temperature 3-18°C) and one of its northernmost populations (Svalbard, North Atlantic, 79°N, habitat temperature 0-6°C). Larvae were exposed to temperatures of 3, 9 and 15°C combined with present day normocapnic (380 ppm CO₂) and near to mid-term future CO₂ concentrations (710 ppm and 3000 ppm CO₂). Calcium content of whole larvae was measured in freshly hatched Zoea I and after 3, 7 and 14 days during the Megalopa stage. Under normocapnia, the calcium content increased with rising temperature and age of the larvae. Significant differences between Helgoland and Svalbard megalopae were observed at all investigated temperatures and CO₂ conditions. At 3 and 9°C Helgoland megalopae accumulated more calcium than Svalbard megalopae, whereas Svalbard megalopae displayed higher calcium contents under 3000 ppm CO₂ at 15°C. Elevated CO₂ levels, especially 3000 ppm, caused a reduction of larval calcium contents at 3 and 9°C in both populations, however, 710 ppm CO₂ affected only Svalbard megalopae at 9°C. In contrast to megalopae from Svalbard, those from Helgoland rapidly replenished the calcium content to normocapnic levels during long term exposure to 3000 ppm CO₂. Our findings of a lower capacity for calcium enrichment in crab larvae living at the cold end of their distribution range suggests that these would be more sensitive to ocean acidification than those in temperate regions.

Introduction

The enhanced emission of anthropogenic CO₂ causes an accumulation of CO₂ in the oceans, which co-occurs with global warming (IPCC 2001, 2007). CO₂ concentrations of about 710 ppm are predicted for the year 2100 and values of about 3000 ppm might be reached by the year 2300, depending on fossil fuel utilization (IPCC 2001, Caldeira and Wickett 2005). CO₂ equilibrates with the ocean surface water and will be distributed by ocean circulation (Orr et al. 2001). The ongoing trends of ocean warming and acidification emphasize the importance of identifying their specific and combined impacts on marine organisms and ecosystems (Pörtner et al. 2005, Pörtner 2008).

The impact of ocean acidification on the calcification of marine animals has been a focus in recent studies (reviews by Fabry et al. 2008, Ries et al. 2009). The rising CO₂ concentrations in the oceans have negative effects on calcified structures of organisms like corals (Gattuso et al. 1998, Kleypass et al. 2006), echinoderms (Kurihara et al. 2004, Wood et al. 2008) and crustaceans (Findlay et al. 2009) due to the lowering of calcification rates which may even lead to abnormal skeletal genesis. Early developmental stages are an important part of the successful life cycle of an animal and may be the most sensitive. Limited information exists on the effects of ocean acidification on developmental stages of invertebrates. Available studies report negative effects of CO₂ on the development, morphology, growth, hatching success or survival of larval stages of e.g. echinodermata or crustaceans (Mayer et al. 2007, Dupont et al. 2008, Kurihara 2008). Reduced calcification rates were found in larval stages of crustaceans like the lobster *Homarus gammarus* (Arnold et al. 2009) or the barnacles *Amphibalanus amphitrite* and *Semibalanus balanoides* (McDonald et al. 2009, Findlay et al. 2010a, b).

Since aquatic CO₂ enrichment depends on latitude and associated temperatures, investigations of ocean acidification effects on the first calcifying developmental stages of marine invertebrates at various latitudes are considered very important (Fabry et al. 2008). However, studies of crustacean larvae living at different latitudes and various temperatures are scarce. Those available focus on older stages, the so-called post-larvae of barnacles (Findlay et al. 2010a, b).

Investigations of CO₂ effects on larvae from the same species across a wide latitudinal cline will exclude the influence of species specific effects and will offer a clear view of how combined acidification and temperature trends affect early

development stages and their physiological capacities. For this purpose the spider crab *Hyas araneus* (L.) was chosen as a model organism for the present study. This species is distributed from the temperate southern North Sea (near Helgoland, Germany) to the sub-Arctic waters of Svalbard (Norway) (Christiansen 1969). In the southern North Sea the species is exposed to a temperature range from 3 to 18°C (Wiltshire and Manly 2004) whereas the region around Svalbard is characterized by temperatures from 0 to 6°C (Svendsen et al. 2002). Adult spider crabs live on stony, sandy and soft bottoms from <1 m down to 360 m, most commonly at depths less than 50 m (Christiansen 1969). Oviparous females release their larvae depending on ambient temperature and associated plankton blooms (Starr et al. 1994, Anger 2001, Hop et al. 2002), around February in the southern North Sea and around March in the sub-Arctic region (Walther et al. in press). The larvae hatch into the first zoeal stage (Zoea I) and moult to Zoea II in a temperature-dependent way. The zoeal stages use thoracopods (maxilliped I and II) to move in the water column (Christiansen 1971) and have long spines attached to their body as a protection against predators (Anger 2001). The carapace of zoeal larvae is soft and has unmineralized chitin layers, which supports a reduction in body weight and thereby enhanced mobility (Anger 2001). After moulting to the Megalopa stage, larvae start to incorporate calcium carbonate into their exoskeleton (Höcker 1988, Anger 2001). Megalopae have a semi-benthic life style and select a suitable habitat for the benthic juvenile and adult life-history stages, before they metamorphose to the first crab instar (Anger 2001).

In crustaceans calcification occurs as the incorporation of calcium carbonate (CaCO_3) into the chitin layer. Crustacean exoskeletons mainly consist of amorphous calcium phosphate in addition to crystalline magnesium calcite in the form of nanocrystals and alpha-chitin (Boßelmann et al. 2007). Calcium is taken up from the ambient water via the gills (Cameron and Wood 1985, Neufeld and Cameron 1993, Flik et al. 1994) and transported into the cells via calcium channels located in the basolateral membrane. For mineralizing the matrix of the cuticle calcium is transported to the extracellular space through the apical membrane by Ca^{2+} -ATPase (Wheatly 1999). The calcium is forwarded to the space between haemolymph and carapace through the basolateral membrane by use of ion transporters like Ca^{2+} -ATPase, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger and $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -exchanger (Neufeld and Cameron 1993, Wheatly 1999). Here, calcium and carbonate combine to form CaCO_3 (Cameron 1985a, b), which is precipitated to the chitin-protein fibers of the exo- and epicuticle (Travis 1955). Carbonate is provided by

the reaction of CO₂ with water catalyzed by carbonic anhydrase and the pH dependent dissociation of bicarbonate (Giraud 1981, Henry and Cameron 1983). Upon acidification the large CaCO₃ reservoir of the shell can be re-mobilized yielding Ca²⁺ and HCO₃⁻ for buffering purposes (Henry et al. 1981, Cameron 1985a, b, Pratoomchat et al. 2002). This may lead to structural changes in the carapace such that it can no longer fully protect the organisms from predators and pathogens (Pratoomchat et al. 2003). The present study investigates to what extent the exposure to combined ocean acidification and warming affects crustacean larvae from different latitudes and their ability to calcify during their development.

Material and methods

Experimental animals

Ovigerous females (15 individuals) of *Hyas araneus* were dredged in January 2008 at 30 to 50 m depths near Helgoland (German Bight, North Sea, 54° 11'N, 7° 53'O). Each female was kept in a flow-through aquarium at ambient water temperatures (4-6°C) and salinity (32‰) at the Biologische Anstalt on Helgoland (Alfred-Wegener-Institute, Germany). Experiments were performed with larvae hatched from the end of January to the end of February 2008.

In July 2008, ovigerous females (60 individuals) of *Hyas araneus* were caught by divers in the Kongsfjorden (Svalbard, Norway, 78° 55'N, 11° 57'O). Females were transported to the Alfred-Wegener-Institute, Bremerhaven (Germany) and kept for 8 months at 5°C in flow-through seawater aquaria. Before hatching, the females were transported to the Biologische Anstalt on Helgoland (Alfred-Wegener-Institute, Germany) where the larvae hatched from the end of February to the beginning of April 2009.

Due to extended and variable periods of reproduction, the number of females contributing to sufficient numbers of offspring during the experimental period was small, including the first three females with hatchlings from Helgoland and the first four females with hatchlings from Svalbard. Each female provided a total of 1350 freshly hatched larvae for experimentation. Per combination of treatments (3 temperatures, 3 CO₂ conditions), 50 larvae each from a single female (three from Helgoland, four from

Svalbard in total) were distributed over seven 0.5-L Kautex-flasks (7 x 50 larvae per female x 9 treatments). Every day the seawater was changed, dead larvae were removed and larvae were fed with freshly hatched *Artemia* sp. Nauplii (50 – 100 food individuals per ml) (San Francisco, Bay Brand).

Zoea I-larvae from the 7 flasks per female that moulted to the next instar Zoea II on the same day were pooled together into a new flask with the same treatment. When up to 12 animals had moulted into Zoea II, they were transferred into 0.2-L Kautex flasks. When more than 12 and up to 30 individuals moulted, we used 0.5-L Kautex flasks. After moulting from Zoea II to the Megalopa instar, we pooled the Megalopa per female and treatment in 0.2-L Kautex flasks (1 to 5 individuals) and 0.5-L Kautex flasks (6 to 15 individuals).

Treatments

Larvae were reared at three different temperatures (3, 9 and 15°C) in combination with three different CO₂ concentrations (normocapnia (= 380 ppm CO₂), 710 ppm and 3000 ppm). Under all conditions, seawater filtered at 0.2 µm was used. For CO₂ concentrations of 710 ppm or 3000 ppm, respectively, 60-L Kautex bottles were filled with filtered seawater and equilibrated with commercial gas mixtures (0.071% carbon dioxide, 21% oxygen in nitrogen or 0.3% carbon dioxide, 21% oxygen in nitrogen, provided by Air liquide). Flasks were closed with a lid to avoid contamination with air and to ensure stable water conditions over 24 hours. On each day seawater removed with the sampling of larvae from the Kautex bottles was replenished, and water pH was recorded (WTW 340i, WTW SenTix HWS). Water samples were removed for alkalinity assays, stabilized with a solution of HgCl₂ (0.02%) and stored at 3°C in 250-mL borosilicate flasks. Total alkalinity was measured by potentiometric titration (Brewer et al. 1986) and calculated from linear Gran Plots. The carbonate system was calculated from temperature, pH, alkalinity and salinity by the CO2Sys program (Lewis and Wallace 1998) using equilibrium constants provided by Mehrbach et al. (1973) and refitted by Dickson and Millero (1987). The parameters of the carbonate system applied during the various treatments are provided by Table 1.

Ion chromatography

Analyses of calcium contents were carried out in six to 13 replicate samples of freshly hatched Zoea I (ZI) and in samples of Megalopa on days 3 (M3), 7 (M7) and 14 (M14). Randomized sampling for each temperature and CO₂ treatment ensured independence from the mother. Larvae were briefly rinsed in Millipore water, blotted on filter paper and transferred in pre-weighed 500 µL cups. After determination of the fresh weight 100 µL Millipore water was added and samples stored frozen at -20°C. For calcium content analyses larvae were defrosted at room temperature and treated with 200 µL 1 M HCl, mixed on a vortex and incubated for 1h (modified after Price and Dendinger, 1983). Preliminary trials with different acid concentrations confirmed the more or less complete extraction of whole body calcium by 1 M HCl. Subsequently, samples were centrifuged for 5min at 20800 rcf (relative centrifugal force). The supernatant was removed and diluted 100-fold with Millipore water. After sample preparation calcium content of the larvae was determined by ion chromatography (ICS-2000, Dionex, Idstein, Germany). Cations (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺) were separated on an IonPac CS15 column with methane sulfonic acid (30 mmol L⁻¹) as an eluent at a flow rate of 0.36 mL min⁻¹ and 40°C. Calcium content was calculated in mg L⁻¹ relative to the Dionex Six Cation-II Standard and is given in mg L⁻¹ per mg fresh weight (fwt).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with STATISTICA software (Version 7.1, StatSoft Inc.) and GraphPad Prism (Version 4, GraphPad Software Inc.). In order to test for the effect of developmental stage (levels: ZI, M3, M7, M14), original population (levels: Helgoland, Svalbard) and temperature (levels: 3, 9, 15°C) on the calcium content of the larvae, individual three-way ANOVAs were applied to the three experimental CO₂ conditions (Normocapnia, 710 ppm, 3000 ppm). In all three cases data were square-root transformed to meet the assumptions of normal distribution (Kolmogorov-Smirnov-test, $P > 0.05$) and homogeneity of variances (Bartlett's test, $P > 0.05$). For the 3000 ppm CO₂ treatment transformation did not lead to the required agreement. However, according to Underwood (1997 cited in Coleman et al. 2006), large designs incorporating three factors are robust against the consequences of deviation from this

assumption. Significant differences between individual groups were identified through pairwise comparisons (Tukey's post-hoc test).

With data from all Megalopa developmental stages pooled together the effect of temperature (3, 9, 15°C) and origin of population (Helgoland, Svalbard) on the calcium content of the larvae was tested by one-way ANOVA. Normal distribution of data was checked by visual inspection of normal plots. The homogeneity of variances was confirmed with Bartlett's test ($P > 0.05$). Differences in the Q_{10} values between populations (Helgoland, Svalbard) were tested by pairwise comparison with students t-test for unpaired data sets. Normal distribution of data was checked by visual inspection of normal plots. The homogeneity of variances was confirmed by application of the F-test ($P > 0.05$).

In order to test for the effect of developmental stage (levels: ZI, M3, M7, M14), temperature (levels: 3, 9, 15°C) and experimental CO₂ conditions (levels: Normocapnia, 710 ppm, 3000 ppm) on the calcium content of the larvae, individual three-way ANOVAs were applied to each the Helgoland and Svalbard population. In both cases data were square-root transformed to meet the assumption of normal distribution (Kolmogorov-Smirnov-test, $P > 0.05$) and homogeneity variances (Bartlett's test, $P > 0.05$). Significant differences between individual groups were identified through pairwise comparisons (Tukey's post-hoc test).

Graphs were developed using GraphPad Prism (Version 4, GraphPad Software Inc.). Values are given as means \pm 1 SE. All analyses were tested at the 0.95% confidence level.

Results

The analysis of larval calcium contents in the two populations (Helgoland, Svalbard) of Zoea I, of Megalopa after 3 (M3), 7 (M7) and 14 (M14) days of development under various temperatures (3°C, 9°C and 15°C) and normocapnic conditions revealed that all factors (developmental stage, population and temperature) affected the content significantly (for all main factors $P < 0.01$; Table 2). Calcium contents in larvae from both *Hyas araneus* populations reared under normocapnic conditions were compared in Figure 1a. The calcium content of freshly hatched Zoea I (ZI) of both Helgoland and Svalbard larvae was about 2 mg L⁻¹ mg(fwt)⁻¹. At 3°C the calcium content of the

Helgoland Zoea I and M3 larvae remained constant and increased significantly to about $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ mg(fwt)}^{-1}$ at the 7th and 14th day of the Megalopa development. The calcium content of Svalbard larvae at 3°C was the same in all developmental stages leading to a significant difference between both populations in M7 and M14. The same pattern could be seen at 9°C , when the calcium content of the Svalbard larvae increased significantly with developmental stage. No significant differences between the two populations could be found at 15°C . Within each population at 15°C the calcium content of all measured Megalopa stages was significantly increased compared to Zoea I

The analyses of the calcium contents of pooled Megalopa developmental stages under three temperatures (3 , 9 , 15°C) and normocapnic conditions revealed no significant differences within the population from Helgoland (Fig. 2, Table 3). Consequently, the calculated Q_{10} values of Helgoland megalopae were low and data not different between 3 and 9°C ($Q_{10} = 1.5 \pm 0.4$) or 9 and 15°C ($Q_{10} = 1.0 \pm 0.3$) ($N = 3$ each, Fig. 2). In contrast, temperature affected the calcium content of the megalopae from Svalbard ($P < 0.01$, Table 3, Fig. 2), where it increased significantly from 3 to 9°C and then 15°C , with Q_{10} values of 1.5 ± 0.1 between 3 and 9°C and $Q_{10} = 2.1 \pm 0.3$ between 9 and 15°C (Fig. 2) (t-test, $P < 0.05$). Furthermore, both populations differed significantly in the temperature-dependent increment of the calcium contents, reflected in the higher Q_{10} value of Svalbard larvae at 9 to 15°C compared to Helgoland larvae at 3 to 9 and 9 to 15°C (t-test, $P < 0.05$).

The analyses of the calcium content of Megalopa from each population (Helgoland, Svalbard) after 3 (M3), 7 (M7) and 14 (M14) days at various temperatures (3°C , 9°C and 15°C) and different CO_2 conditions (Normocapnia, 710 ppm , 3000 ppm) revealed that all factors (developmental stage, temperature and CO_2) affected the content (for all main factors $P < 0.01$; Table 4). At 3°C , all Megalopa stages (M3, M7, M14) of the Helgoland population showed a significant decrease of the calcium content from normocapnia to 3000 ppm CO_2 (Fig. 3a). In contrast, differences remained insignificant between megalopae reared under normocapnia compared to those reared under 710 ppm CO_2 . At 9°C Helgoland megalopae of the 3rd and 7th day displayed a significant decrease of the calcium content at 3000 ppm CO_2 compared to larvae reared under normocapnia (Fig. 3a). However, the calcium content of M14 megalopae had increased and was again similar under control and all CO_2 conditions. At 15°C all megalopae maintained the same calcium level under all CO_2 conditions (Fig. 3a).

Like megalopae from Helgoland at 3°C, megalopae from Svalbard reared at 3000 ppm CO₂ and 3°C displayed a significantly lower calcium content compared to megalopae from the same population reared under normocapnia or 710 ppm CO₂ (Fig. 3b). At 9°C, the calcium contents of all megalopae sampled for up to 14 days were significantly decreased under 3000 ppm CO₂ when compared to normocapnia and 710 ppm CO₂. The calcium content of M3 megalopae reared under 710 ppm fell earlier than in the others and reached similarly low calcium levels as megalopae under 3000 ppm CO₂ (Fig. 3b). At 15°C (Fig. 3b), the significant drop in calcium contents of M3 under 3000 ppm CO₂ was reversed leading to levels similar to those in controls M7 and M14.

The analyses of the calcium contents of Zoea I and Megalopae after 3 (M3), 7 (M7) and 14 (M14) days from the two populations (Helgoland, Svalbard) under various temperatures (3°C, 9°C and 15°C) and at 710 ppm or 3000 ppm CO₂, respectively, revealed that all factors (developmental stage, population and temperature) affected the content significantly (for all main factors $P < 0.001$; Table 2). Although not all interactions between two factors were significant, the results indicate that the calcium content of individuals originating from Helgoland and Svalbard were affected differently by temperature and that this was different between the developmental stages under study (P for interactions of all three factors < 0.001 ; Table 2).

The calcium content of larvae from both populations reared at 710 ppm CO₂ displayed an increment with progressive development which differed significantly between both populations, at 3 and 9°C (Fig. 1b). At 3°C the calcium content of 14 day Megalopa (M14) from Helgoland was significantly higher than in M14 from Svalbard. At 9°C, the calcium contents of larvae from Helgoland was also significantly higher than in those from Svalbard, now in M3 and additionally in M14. At 15°C, the calcium content increased similarly within each population from Zoea I to M3/M7/M14.

Figure 1c shows the calcium content of larvae from Helgoland and Svalbard reared under 3000 ppm CO₂. At 3°C, the calcium content of Helgoland larvae decreased significantly from ZI to M3 and increased within 14 days to the same level as in ZI. The calcium content in larvae from Svalbard decreased from ZI to M7, and then rose to similar levels in M14 as in Zoea I and M3. At 9°C, calcium contents in megalopae from Svalbard remained low and revealed no rise during development under elevated CO₂ levels. In contrast, the calcium content of larvae from Helgoland first decreased significantly from ZI to M3. This decrease was compensated for after 14 days at the Megalopa stage. Moreover, the calcium content in M7 and M14 was significantly

higher in specimens from Helgoland than in those from Svalbard. At 15°C, a significant increase in calcium content from ZI/M3 and M7/M14 could be detected in both populations. Interestingly, the main difference between populations is obviously seen in M14, with a higher calcium content in larvae from Svalbard than in those from Helgoland.

Discussion

Comparison of Northern and Southern Populations

The calcification of decapod crustacean larvae starts with the moult to the Megalopa stage (Anger 2001). Accordingly, the calcification of *Hyas araneus* Megalopa, 3, 7 and 14 days after moult, and, as a reference, of freshly hatched Zoea I larvae, was a focus of this study. Under normocapnic conditions the calcium content of freshly hatched Zoea I larvae was about 2 mg L⁻¹ mg(fwt)⁻¹, similar to the calcium content of megalopae after 3 days, at least at 3°C (Fig. 1a). This calcium content originates from the influx of calcium over the whole zoea body surface through their thin unmineralized cuticula (Pütz and Buchholz 1991, Anger 2001) and is in equilibration with the ambient water. In megalopae the calcium content increases due to the calcification process, which advances the calcium entry by passive and active transport mechanisms via the gills (Cameron and Wood 1985, Neufeld and Cameron 1993, Flik et al. 1994).

Calcification as reflected in the accumulation of calcium in *Hyas araneus* larvae, increased with developmental stage (Fig. 1a). The calcium content of larvae reared under normocapnic conditions increased with continuous development (Fig. 1a) and growth over time (Walther et al. in press). Similar to lobster larvae, older larval stages displayed the highest calcium content and growth rates (Arnold et al. 2009). The calcium analysed mainly represents calcium bound by the carapace layers, which was dissolved by exposure to HCl (Price and Dendinger 1983). The calcification process in crustaceans proceeds during a defined moulting pattern with several phases (postmolt, intermolt, premolt, ecdysis) (Roer and Dillaman 1984, Pratoomchat et al. 2002). In crustacean larvae, moulting is important for growth and for the formation of various larval stages with morphological differences (Anger 2001). During the first days of the Megalopa stage, representing the early postmolt phase, cuticle formation starts and

involves the mineral nucleation of bound calcium salts (Pratoomchat et al. 2002). The intermolt is characterized by an intense calcareous thickening, which is due to the incorporation of calcite (Roer and Dillaman 1984). At each temperature, progressive calcification of the larval carapace of *Hyas araneus* occurred during the first 14 days of Megalopa development as illustrated by the increasing calcium contents (Fig. 1a).

Furthermore, the calcification rate was clearly temperature-dependent, but only in *Hyas araneus* larvae from Svalbard, where the calcium content was reduced at low temperatures and enhanced by warming (Fig. 2), as illustrated by the Q_{10} values found between 3 and 9°C and 9 to 15°C (Fig. 2). In contrast, calcification in larvae from Helgoland was not temperature-dependent (Fig. 2). These findings suggest that Svalbard larvae were able to exploit rising temperatures by enhancing calcification. The observed temperature-dependent calcium content is an indicator for the coupling of the calcification process to temperature-dependent enzymatic mechanisms, like Ca^{2+} -ATPase, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - exchange and $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ - exchange or carbonic anhydrase (Giraud 1981, Neufeld and Cameron 1993, Wheatly 1999). Similar to *Hyas araneus* from Svalbard, the barnacle *Chtalamus montagui*, which lives at habitat temperatures from about 9 to 17°C, displayed a lower level of calcification at low temperatures (Clavier et al. 2009). Ostracods, living in habitat temperatures from about 13 to 20°C, also demonstrated a temperature-dependent calcification rate, with decreased moulting and calcification rates associated with reduced survival at a relatively low temperature of 13°C (Mezquita et al. 1999). Studies in crayfish also demonstrated temperature-dependent calcification with reduced mineralization in cold waters and higher mineralization observed in crayfish living in warm waters (Lahti 1988).

Overall, the comparison of populations from Helgoland and Svalbard revealed significant differences under normocapnia, denoted by a higher calcium contents of megalopae from Helgoland than in those from Svalbard at 3°C (Fig. 1a). Svalbard megalopae could not set their calcification rate during the first 14 days to the same level as megalopae from Helgoland at the same temperature. Possibly, enzymes and transporters supporting the active influx of calcium ions and their assembly into the chitin layer (Giraud 1981, Neufeld and Cameron 1993, Wheatly 1999), differ in their expression or activity between both populations. Alternatively, energy allocation to calcification may be limiting in the population from Svalbard and delay the accumulation of carbonates. It is surprising though that Svalbard larvae, which do live at temperatures between 0 and 6°C display lower calcification rates in the cold than

Helgoland larvae at the same temperature, as they have their lowest habitat temperature at 3°C. This contrasts the patterns of cold compensation in metabolic enzymes, which is frequently observed in cold adapted eurytherms (Pörtner 2006). For a detailed explanation of the different calcium levels, studies of the enzymes and transporters involved in the calcification process are necessary. The overall change in calcium levels suggests that cold compensation occurs in the temperate eurythermal North Sea population more than in the cold adapted Svalbard population. This may suggest a reduction in energy turnover in the Arctic population, which may in fact have developed cold stenothermy characteristics (cf. Pörtner 2006).

At 9°C, the calcium content of *H. araneus* larvae from Svalbard was still significantly reduced compared to larvae from Helgoland at 9°C (Fig. 1a) emphasizing the conclusions above. Calcification rate increased with rising temperature (Q_{10} (9-15°C) = 2.1 ± 0.3) in larvae from Svalbard only (Fig. 2). Again, megalopae from Helgoland displayed no further increment in calcium contents upon warming (Fig. 2). This would be in line with the suggested cold compensation of calcification rates in larvae from Helgoland at 3°C, as cold compensated mechanisms in eurytherms have been found to display low Q_{10} values (cf. Pörtner 2006). Finally, at 15°C the calcification level of each megalopae stage was similar within and between both populations (Fig. 1a). However, this observation is paralleled by progressively lower growth rates and fitness levels in warm exposed megalopae from Svalbard compared to those from Helgoland (Walther et al. in press). As a hypothesis higher temperatures may cause energy to be reallocated to calcification at the expense of somatic fitness during the first 14 days of the Megalopa stage at Svalbard. Loss of fitness is reflected in the high mortality and extremely delayed development of *Hyas araneus* megalopae from Svalbard at 9 and 15°C, associated with reduced success rates in the metamorphosis of megalopae to the first juvenile stage (Walther et al. in press). For comparison, the barnacle *Semibalanus balanoides* displayed reduced calcification at high water temperature (19°C), which was associated with reduced survival and growth rates (Findlay et al. 2010a). An optimized balance between calcification and developmental rates may thus be crucial in recruitment success.

CO₂ exposure

In both populations of *H. araneus*, differences in larval calcium content after exposure to several temperatures and elevated CO₂ concentrations are depicted in Figure 1b, c and 3. During development megalopae from Helgoland reared at 3 and 9°C maintained significantly higher calcium contents than larvae from Svalbard even at elevated CO₂ tensions, emphasizing the higher capacity for calcification in the population from Helgoland as elaborated above (Fig. 1b, c).

Under elevated CO₂ levels, larvae exposed to 3000 ppm CO₂ in particular, showed a significant decrease in their calcium content and therefore in calcification compared to larvae exposed to normocapnia or 710 ppm CO₂. Only at 9°C megalopae from Helgoland showed high calcium levels and no significant difference between exposures to 710 ppm and 3000 ppm CO₂ (Fig. 3a). Svalbard larvae were affected by exposure to 710 ppm CO₂, illustrated by a significant decrease in the calcium content of M3 reared at 9°C (Fig. 3b). These results demonstrate that ocean acidification impacts calcium deposition into the carapace. Arnold et al. (2009) showed similar effects for lobster larvae (*Homarus gammerus*), where the calcium content of the last zoeal stage was reduced after exposure to 1200 ppm CO₂. The same effect could be seen in the mud crab *Scylla serrata*, where a lower water pH (pH 7.5, pH reduction caused by fixed acid titration) resulted in a reduction of the calcium content (Pratoomchat et al. 2003).

Lower calcium contents at higher CO₂ concentrations were presumably caused by the reduced availability of carbonate for calcium precipitation at the deposition site. Moreover, deposited CaCO₃ can also be re-mobilized to compensate for an acidification of body fluids (Henry et al. 1981, Giraud 1981). The HCO₃⁻ supplied from the carapace is transported to the haemolymph and contributes to the acute buffering of hypercapnic acidosis (Henry and Cameron 1983, Cameron 1985a). Calcium ions will then be released from the carapace as well and be transported to the haemolymph via several ion transporters and finally lost via the gills to the ambient water (Cameron and Wood 1985, Neufeld and Cameron 1993).

Differences in the response to CO₂ between the populations from Helgoland and Svalbard were found in larvae exposed to 710 ppm and 3000 ppm CO₂. At 710 ppm CO₂, the increase in calcium content of the larvae appeared delayed compared to controls (Fig. 1b vs. Fig. 1a). The delay was less in larvae from Helgoland than in those from Svalbard (Fig. 1b). This is in accordance with growth and fitness data of *Hyas*

araneus larvae investigated by Walther et al. (in press), where Helgoland larvae developed faster than Svalbard larvae. Consequently, the post- and intermoulting processes set in earlier in megalopae from Helgoland than in those from Svalbard.

At 3000 ppm CO₂, the accumulation of calcium in all larvae was disturbed, especially at 3 and 9°C (Fig. 1c). For example, megalopae from Svalbard at 3°C showed a drastic decrease of their calcium contents to values lower than 0.5 mg L⁻¹ mg(fwt)⁻¹. After 3 days, megalopae from both Helgoland and Svalbard displayed a lower calcium content than Zoea I but were able to restore these levels when reaching M14. Active transport by ion exchange likely caused the accumulation of calcium levels to support the calcification of the carapace (Cameron and Wood 1985, Neufeld and Cameron 1993, Flik et al. 1994). As already explained Zoea larvae possess a thin cuticula and ions may permeate over the whole body surface (Pütz and Buchholz 1991, Anger 2001). Megalopae have a thicker cuticula such that ion transport only occurs via the gills. Nonetheless, they are able to compensate for the CO₂ induced loss in calcium levels.

A comparison of calcium contents with dry weight data of *H. araneus* (Walther et al. in press) at 3°C reveals that in megalopae from Helgoland the decrease in calcium content was associated with a reduction in dry mass, whereas in Svalbard megalopae dry mass remained constant despite reduced calcium contents. These findings would indicate that elevated CO₂ levels affected the carapace structure in both populations differently. Low calcium contents and constant dry weights in larvae from Svalbard lead to the conclusion that they compensated for the reduced amount of calcium carbonate by increased chitin contents in the carapace. Likewise, Pratoomchat et al. (2003) observed changes in the exoskeletal structure of the mud crab (*Scylla serrata*) associated with an increased content of polymerised chitin in the epidermis after exposure to pH 7.5. Similarly, the chitin matrix of the cuttlebone of the cephalopod *Sepia officinalis* was visibly more compact under elevated CO₂ levels (Gutowska et al. 2010).

Similar to observations at 3°C, larvae at 9°C experienced decreasing calcium contents during moulting from Zoea I to Megalopa, followed by a compensatory increase to the same level in M14 as in Zoea I (Fig. 1c). It seems that the period of loss was shortened and that compensation occurred more rapidly at 9°C than at 3°C. For the same reason Helgoland larvae at 9°C were able to increase their calcium content to a higher level at M14 than in Zoea I.

Interestingly and in contrast to these findings, calcium content in M14 from Svalbard at 15°C and exposed to 3000 ppm was significantly increased compared to those from Helgoland (Fig. 1c) and similar to levels under normocapnia (Fig. 3b). This observation resembles those in the barnacle *Amphibalanus amphitrite*, exposed to enhanced CO₂ conditions (pH 7.4) and can be explained by compensatory calcification in active growth zones of the shells. However, this compensation was insufficient to prevent the weakening of shell walls at reduced pH (McDonald et al. 2009). The reduced survival and disturbed metamorphosis of *Hyas araneus* megalopae suggests that the compensatory increase in calcification rate cannot alleviate the acidifying effects of high CO₂ levels and the associated unfavourable shift in energy budget (see above). Acceleration of the compensation process at 15°C would explain why larvae from Svalbard reached a higher calcium content in the Megalopa than the Zoea stages, similar to larvae exposed to normocapnia and at 710 ppm CO₂ (Fig. 3b). It remains to be explored whether the compensation process is due to the kinetic stimulation of calcification due to warmer temperatures or whether it involves a change in the gene expression of associated mechanisms.

Conclusion

At first sight, elevated CO₂ conditions impact *Hyas araneus* megalopae mostly at 3 and 9°C, exacerbating the consequences of slowed temperature-dependent larval development (Anger and Nair 1979, Walther et al. in press). As a result, larvae exposed to different temperature and CO₂ conditions spend different periods under the respective conditions before they moult to Megalopa stage. It can therefore be assumed that the slowed development of zoeal stages under ocean acidification (Walther et al. in press) translates to the constitution and hence, the calcification status of the Megalopa stages.

The reduced calcium content of *H. araneus* megalopae at 3 and 9°C and low pH indicates a reduction of calcification rates. Carbonate levels are reduced and cannot easily precipitate with calcium in the exoskeleton. At 3°C, the effect of ocean acidification is more prominent than at warmer temperatures. Presumably, the prolonged developmental time at colder temperatures goes hand in hand with the deceleration of the calcification process. This suggests that animals living in the cold would be more affected by ocean acidification than those in temperate regions. Since

calcification is reduced, the strength of the exoskeleton as an efficient protection mechanism against predators or pathogens may also be reduced.

The elevation of calcium levels in megalopae at 15°C contrasts findings in barnacle post-larvae, where the calcium content was always reduced under elevated CO₂ conditions compared to normocapnia (Findlay et al. 2010a). It remains unclear, however, whether such reduction occurred at high temperatures beyond the borders of their window of thermal tolerance. In case of *H. araneus* from Svalbard at 15°C the drastic delay of development reflects the surpassing of thermal limits (Walther et al. in press) but this may not necessarily imply an early loss of calcium levels in the exoskeleton. Overall, ocean acidification has the potential to cause an imbalance between somatic and carapace growth and composition as well as associated disturbances in energy budget. These disturbances have species-specific implications and consequences depending on the climate regime where such influences are observed. For a species at its lower temperature limits such as *Hyas araneus* at Svalbard, the patterns observed indicate an imbalance in energy budget, at the expense of growth and development and thus a higher sensitivity to ocean acidification than seen in the warmth.

Acknowledgements This work is a contribution to the "European Project on Ocean Adification" (EPOCA) which received funding from the European Community's Seventh Framework programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 211384. EPOCA is endorsed by the International Programme LOICZ. Supported by the Mar Co Pol I research program of the Alfred-Wegener-Institute and the BIOACID program of the Federal Ministry of Research, Germany. We would like to thank Karin Boos, Pauline Dierichsweiler, Katharina Michael, Stefanie Schnell, Karoline Schreiber and Lena Weber for excellent technical assistance.

References

- Anger K, Nair KKC (1979) Laboratory experiments on the larval development of *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). Helgol Meeresunters 32:36-54
- Anger K (2001) The biology of decapod crustacean larvae. Crustacean Issue 14. A.A.

- Balkema Publishers, Swets and Zeitlinger, Lisse, p 1-420
- Arnold KE, Findlay HS, Spicer JI, Daniels CL, Boothroyd D (2009) Effect of CO₂-related acidification on aspects of the larval development of the European lobster, *Homarus gammarus* (L.). *Biogeosciences* 6:1747-1754.
- Boßelmann F, Romano P, Fabritius H, Raabe D, Epple M (2007) The composition of the exoskeleton of two crustacea: the American lobster *Homarus americanus* and the edible crab *Cancer pagurus*. *Thermochimica Acta* 463:65-68
- Brewer PG, Bradshaw AL, Williams RT (1986) Measurement of total carbon dioxide and alkalinity in the North Atlantic Ocean in 1981. In: Trabalka, J.R., Reichle, D.E. (ed) *The Changing Carbon Cycle - a Global Analysis*. Springer. New York: p 358-381
- Caldeira K, Wickett M E (2005) Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J Geophys Res* 110: C09S04, doi:10.1029/2004JC002671
- Cameron JN (1985a) Compensation of hypercapnic acidosis in the aquatic blue crab, *Callinectes sapidus*: the predominance of external sea water over carapace carbonate as the proton sink. *J Exp Biol* 114:197-206
- Cameron JN (1985b) Post-moult calcification in the blue crab (*Callinectes sapidus*): relationships between apparent net H⁺ excretion, calcium and bicarbonate. *J Exp Biol* 119:275-285
- Cameron JN, Wood CM (1985) Apparent H⁺ excretion and CO₂ dynamics accompanying carapace mineralization in the blue crab (*Callinectes sapidus*) following moulting. *J Exp Biol* 114:181-196
- Christiansen ME (ed) (1969) *Crustacea Decapoda Brachyura*. In: *Marine Invertebrates of Scandinavia*. No. 2, Universitetsforlaget, Oslo
- Christiansen ME (1971) Larval development of *Hyas araneus* (Linnaeus) with and without antibiotics (Decapoda, Brachyura, Majidae). *Crustaceana* 21:307-315
- Clavier J, Castets M-D, Bastian T, Hily C, Boucher G, Chauvaud L (2009) An amphibious mode of life in the intertidal zone: aerial and underwater contribution of *Chthamalus montagui* to CO₂ fluxes. *Mar Ecol Prog Ser* 375: 185-194
- Coleman RA, Underwood AJ, Benedetti-Cecchi L, Åberg P, Arenas F, Arrontes J, Castro J, Hartnoll RG, Jenkins SR, Paula J, Della Santina P, Hawkins SJ (2006) A continental scale evaluation of the role of limpet grazing on rocky shores.

Oecologia 147:556-564

- Dickson AG, Millero FJ (1987) A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Res* 34:1733-1743
- Dupont S, Havenhand J, Thorndyke W, Peck L, Thorndyke M (2008) Near-future level of CO₂-driven ocean acidification radically affects larval survival and development in the brittlestar *Ophiothrix fragilis*. *Mar Ecol Prog Ser* 373:285-294
- Fabry VJ, Seibel BA, Feely RA, Orr JC (2008) Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES J Mar Sci* 65:414-432
- Findlay HS, Kendall MA, Spicer JI, Widdicombe S (2009) Future high CO₂ in the intertidal may comprise adult barnacle *Semibalanus balanoides* survival and embryonic development rate. *Mar Ecol Prog Ser* 389:193-202
- Findlay HS, Kendall MA, Spicer JI, Widdicombe S (2010a) Relative influences of ocean acidification and temperature on intertidal barnacle post-larvae at the northern edge of their geographic distribution. *Estuar Cost Shelf Sci* 86:675-682
- Findlay HS, Kendall MA, Spicer JI, Widdicombe S (2010b) Post-larval development of two intertidal barnacles at elevated CO₂ and temperature. *Mar Biol* 157:725-735
- Flik G, Verboost PM, Atsam W (1994) Calcium transport in gill plasma membranes of the crab *Carcinus maenas*: evidence for carriers driven by ATP and a Na⁺ gradient. *J Exp Biol* 195:109-122
- Gattuso J-P, Frankignoulle M, Bourge I, Romaine S, Buddemeier RW (1998) Effect of calcium carbonate saturation of seawater on coral calcification. *Glob Planetary Change* 18:37-46
- Giraud M-M (1981) carbonic anhydrase activity in the integument of the crab *Carcinus maenas* during the intermolt cycle. *Comp Biochem Physiol* 69:381-387
- Gutowska MA, Melzner F, Pörtner HO, Meier S (2010) Cuttlebone calcification increases during exposure to elevated seawater pCO₂ in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Mar Biol* 157: 1653-1663
- Henry RP, Kormanik GA, Smatresk NJ, Cameron JN (1981) The role of CaCO₃ dissolution as a source of HCO₃⁻ for the buffering of hypercapnic acidosis in aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *J Exp Biol* 94:269-274
- Henry RP, Cameron JN (1983) The role of carbonic anhydrase in respiration, ion regulation and acid-base balance in the aquatic crab *Callinectes sapidus* and the terrestrial crab *Gecarcinus lateralis*. *J exp Biol* 103:205-223

- Hop H, Pearson T, Hegseth EN, Kovacs KM, Wiencke C, Kwasniewski S, Eiane K, Mehlum F, Gulliksen B, Wlodarska-Kowalczyk M, Lydersen C, Weslawski JM, Cochrane S, Gabrielsen GW, Leakey RJG, Lønne OJ, Zajaczkowski M, Falk-Petersen S, Kendall M, Wängberg S-Å, Bischof K, Voronkov AY, Kovaltchouk NA, Wiktor J, Poltermann M, di Prisco G, Papucci C, Gerland S (2002) The marine ecosystem of Kongsfjorden, Svalbard. *Polar Res* 21:167-208
- Höcker B (1988) Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Larval- und Juvenilentwicklung der Seespinne (*Hyas araneus*) unter besonderer Berücksichtigung des Y-Organs. M. Sc. Thesis, Universität Hamburg, Germany, 111pp.
- IPCC (2001) *Climate Change 2001, Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge
- IPCC (2007) *Climate Change 2007, Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge
- Kleypas JA, Feely RA, Fabry VJ, Langdon C, Sabine CL, Robbins LL (2006) Impacts of ocean acidification on coral reefs and other marine calcifiers: a guide for future research. Report of a workshop held 18-20 April 2005, St. Petersburg, FL, sponsored by NSF, NOAA, and the US Geological Survey, 88 pp.
- Kurihara H, Shimode S, Shirayama Y (2004) Effects of raised CO₂ concentration on the egg production rate and early development of two marine copepods (*Arctica steueri* and *Acartia erythraea*). *Mar Poll Bull* 49:721-727
- Kurihara H (2008) Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Mar Ecol Prog Ser* 373:275-284
- Lahti E (1988) Calcification of the exoskeleton and gastrolithes in *Astacus astacus* L. in calcium-poor water. *Comp Biochem Physiol* 91:171-173
- Lewis E, Wallace DWR (1998) Program developed for CO₂ system calculations. ORNL/CDIAC-105. Carbon Dioxide Information Analysis Center. Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy
- Mayer DJ, Matthews C, Cook K, Zuur AF, Hay S (2007) CO₂-induced acidification affects hatching success in *Calanus finmarchicus*. *Mar Ecol Prog Ser* 350:91-97
- McDonald MR, McClintock JB, Amsler CD, Rittschof D, Angus RA, Orihuela B, Lutostanski K (2009) Effects of ocean acidification over the life history of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*. *Mar Ecol Prog Ser* 385:179-187

- Mezquita F, Roca J, Wansard G (1999) Moulting, survival and calcification: the effects of temperature and water chemistry on an ostracod crustacean (*Herpetocypris intermedia*) under experimental conditions. Arch Hydrobiol 146:219-238
- Mehrbach C, Culberson C, Hawley J, Pytkowicz R (1973) Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. Limnol Oceanogr 18:897-907
- Neufeld DS, Cameron JN (1993) Transepithelial movement of calcium in crustaceans. J Exp Biol 184:1-16
- Orr JC, Maier-Reimer E, Mikolajewicz U, Monfray P, Samiento JL, Toggweiler JR, Taylor NK, Palmer J, Gruber N, Sabine CL, Le Quéré C, Key RM, Boutin J (2001) Estimates of anthropogenic carbon uptake from four three-dimensional global ocean models. Global Biogeochem Cy 15:43-60
- Pörtner HO, Langenbuch M, Michaelidis B (2005) Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: From Earth history to global change. J Geophys Res 110: C09S10, doi:10.1029/2004JC002561
- Pörtner HO (2006) Climate-dependent evolution of Antarctic ectotherms: An integrative analysis. Deep-Sea Res 54: 1071-1104
- Pörtner HO (2008) Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. Mar Ecol Prog Ser 373:203-217
- Pratoomchat B, Sawangwong P, Guedes R, De Lurdes Reis M, Machado J (2002) Cuticle ultrastructure changes in the crab *Scylla serrata* over the molt cycle. J Exp Zool 293:414-426
- Pratoomchat B, Sawangwong P, Machado J (2003) Effects of controlled pH on organic and inorganic composition in haemolymph, epidermal tissue and cuticle of mud crab *Scylla serrata*. J Exp Zool 295:47-56
- Price SWC, Dendigner JE (1983) Calcium deposition into the cuticle of the blue crab, *Callinectes sapidus*, related to external salinity. Comp Biochem Physiol A 74: 903-907.
- Pütz K, Buchholz F (1991) Comparative ultrastructure of the cuticle of some pelagic, nektobenthic and benthic malacostracan crustaceans. Mar Biol 110:49-58
- Ries JB, Cohen AL, McCorkle DC (2009) Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO₂-induced ocean acidification. Geology 37:1131-1134
- Roer R, Dillaman R (1984) The structure and calcification of the crustacean cuticle. Amer Zool 24:893-909

- Starr M, Therriault J-C, Conan GY, Comeau M, Robichaud G (1994) Larval release in a sub-euphotic zone invertebrate triggered by sinking phytoplankton particles. *J Plankton Res* 16:1137-1147
- Svendsen H, Breszczyńska-Møller A, Hagen JO, Lefauconnier B, Tverberg V, Gerland S, Ørbæk JB, Bischof K, Papucci C, Zajaczkowski M, Azzolini R, Bruland O, Wiencke C, Winther J-G, Dallmann W (2002) The physical environment of Kongsfjorden-Krossfjorden, an Arctic fjord system in Svalbard. *Polar Res* 21:133-166
- Travis DF (1955) The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus agrus* Latreille. II. Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. *Biol Bull* 108:88-112
- Underwood AJ (1997) Experiments in ecology. Their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge, University Press
- Walther K, Anger K, Pörtner HO (2010) Impact of ocean acidification and warming on the larval development of the spider crab *Hyas araneus* (L.) from different latitudes (54° vs 79°N). *Mar Ecol Prog Ser*, in press
- Wheatly MG (1999) Calcium homeostasis in crustacea: the evolving role of branchial, renal, digestive and hypodermal epithelia. *J Exp Zool* 283:620-640
- Wiltshire KH, Manly BFJ (2004) The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: phytoplankton response. *Helgol Mar Res* 58:269-273
- Wood HL, Spicer JJ, Widdicombe S (2008) Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. *Proc R Soc B* 275:1767-1773

Table 1 Parameters of the seawater carbonate system calculated from temperature, pH (NIST-scale), total alkalinity (TA) and salinity (32‰) using the CO2Sys program (Lewis & Wallace 1998). Mean values \pm SD (N = 10)

| Temp (°C) | Treatment | pH | TA ($\mu\text{mol/kg}$) | PCO ₂ (μatm) |
|-----------|-----------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------------------|
| 3 | Normocapnia (380 ppm) | 8.11 \pm 0.05 | 2405 \pm 7 | 354 \pm 65 |
| | 710 ppm | 7.81 \pm 0.03 | 2405 \pm 4 | 754 \pm 37 |
| | 3000 ppm | 7.33 \pm 0.03 | 2405 \pm 6 | 2378 \pm 164 |
| 9 | Normocapnia (380 ppm) | 8.12 \pm 0.07 | 2404 \pm 8 | 346 \pm 80 |
| | 710 ppm | 7.81 \pm 0.03 | 2403 \pm 6 | 786 \pm 54 |
| | 3000 ppm | 7.35 \pm 0.04 | 2406 \pm 8 | 2443 \pm 238 |
| 15 | Normocapnia (380 ppm) | 8.05 \pm 0.04 | 2409 \pm 2 | 401 \pm 30 |
| | 710 ppm | 7.79 \pm 0.04 | 2409 \pm 4 | 846 \pm 42 |
| | 3000 ppm | 7.34 \pm 0.04 | 2409 \pm 2 | 2637 \pm 160 |

Table 2 *Hyas araneus*. Results of the three-way ANOVAs concerning the calcium content of larvae under normocapnia (square-root transformed), 710 ppm (square-root transformed) and 3000 ppm CO₂ (N = 6-13)

| Source of variation | df | SS | MS | F | P |
|--|-----|------|------|--------|----------------|
| <i>Calcium content of larvae under normocapnia (Fig. 1a)</i> | | | | | |
| Stage | 3 | 9.6 | 3.2 | 111.19 | < 0.001 |
| Population | 1 | 1.99 | 2.0 | 69.15 | < 0.001 |
| Temperature | 2 | 2.4 | 1.2 | 41.63 | < 0.001 |
| Stage*Population | 3 | 0.3 | 0.1 | 3.23 | < 0.05 |
| Stage*Temperature | 6 | 1.2 | 0.2 | 6.85 | < 0.001 |
| Population*Temperature | 2 | 0.9 | 0.4 | 15.39 | < 0.001 |
| Stage*Population*Temperature | 6 | 0.6 | 0.1 | 3.59 | < 0.01 |
| Residuals | 171 | 4.9 | 0.0 | | |
| <i>Calcium content of larvae under 710 ppm CO₂ (Fig. 1b)</i> | | | | | |
| Stage | 3 | 9.3 | 3.1 | 112.64 | < 0.001 |
| Population | 1 | 1.0 | 1.0 | 36.18 | < 0.001 |
| Temperature | 2 | 4.7 | 2.3 | 85.18 | < 0.001 |
| Stage*Population | 3 | 0.2 | 0.1 | 2.23 | 0.09 |
| Stage*Temperature | 6 | 2.3 | 0.4 | 14.24 | < 0.001 |
| Population*Temperature | 2 | 1.7 | 0.9 | 31.53 | < 0.001 |
| Stage*Population*Temperature | 6 | 1.3 | 0.2 | 7.65 | < 0.001 |
| Residuals | 179 | 4.9 | 0.0 | | |
| <i>Calcium content of larvae under 3000 ppm CO₂ (Fig. 1c)</i> | | | | | |
| Stage | 3 | 44.3 | 14.8 | 65.88 | < 0.001 |
| Population | 1 | 7.8 | 7.8 | 34.81 | < 0.001 |
| Temperature | 2 | 95.2 | 47.6 | 212.35 | < 0.001 |
| Stage*Population | 3 | 1.3 | 0.4 | 1.90 | 0.13 |
| Stage*Temperature | 6 | 46.1 | 7.7 | 34.24 | < 0.001 |
| Population*Temperature | 2 | 12.5 | 6.2 | 27.89 | < 0.001 |
| Stage*Population*Temperature | 6 | 12.9 | 2.1 | 9.56 | < 0.001 |
| Residuals | 178 | 39.9 | 0.2 | | |

Table 3 *Hyas araneus*. Results of the one-way ANOVA of pooled Megalopa stages from each population (Helgoland, Svalbard) (N = 3)

| Source of variation | df | SS | MS | F | P |
|-------------------------------|----|-----|-----|-------|---------------|
| <i>Megalopae of Helgoland</i> | | | | | |
| Temperature | 2 | 0.9 | 0.4 | 0.53 | 0.61 |
| Residuals | 6 | 4.9 | 0.8 | | |
| <i>Megalopae of Svalbard</i> | | | | | |
| Temperature | 2 | 6.1 | 3.0 | 13.88 | < 0.01 |
| Residuals | 6 | 1.3 | 0.2 | | |

Table 4 *Hyas araneus*. Results of the three-way ANOVAs concerning the calcium content of Helgoland and Svalbard larvae after square-root transformation (N = 6-13)

| Source of variation | df | SS | MS | F | P |
|---|-----|------|-----|--------|----------------|
| <i>Calcium content of Helgoland megalopae (Fig. 3a)</i> | | | | | |
| Stage | 2 | 8.0 | 4.0 | 75.02 | < 0.001 |
| Temperature | 2 | 4.9 | 2.4 | 45.99 | < 0.001 |
| CO ₂ | 2 | 9.4 | 4.7 | 87.97 | < 0.001 |
| Stage*Temperature | 4 | 1.1 | 0.3 | 5.03 | < 0.001 |
| Stage* CO ₂ | 4 | 0.6 | 0.1 | 2.66 | < 0.05 |
| Temperature* CO ₂ | 4 | 2.8 | 0.7 | 13.22 | < 0.001 |
| Stage*Temperature* CO ₂ | 8 | 1.3 | 0.2 | 3.10 | < 0.01 |
| Residuals | 210 | 11.2 | 0.1 | | |
| <i>Calcium content of Svalbard megalopae (Fig. 3b)</i> | | | | | |
| Stage | 2 | 4.8 | 2.4 | 76.43 | < 0.001 |
| Temperature | 2 | 19.5 | 9.8 | 310.09 | < 0.001 |
| CO ₂ | 2 | 8.6 | 4.3 | 136.38 | < 0.001 |
| Stage*Temperature | 4 | 0.5 | 0.1 | 4.23 | < 0.01 |
| Stage* CO ₂ | 4 | 0.6 | 0.2 | 5.01 | < 0.001 |
| Temperature* CO ₂ | 4 | 1.4 | 0.3 | 11.03 | < 0.001 |
| Stage*Temperature* CO ₂ | 8 | 1.2 | 0.1 | 4.63 | < 0.001 |
| Residuals | 173 | 5.4 | 0.0 | | |

Figures

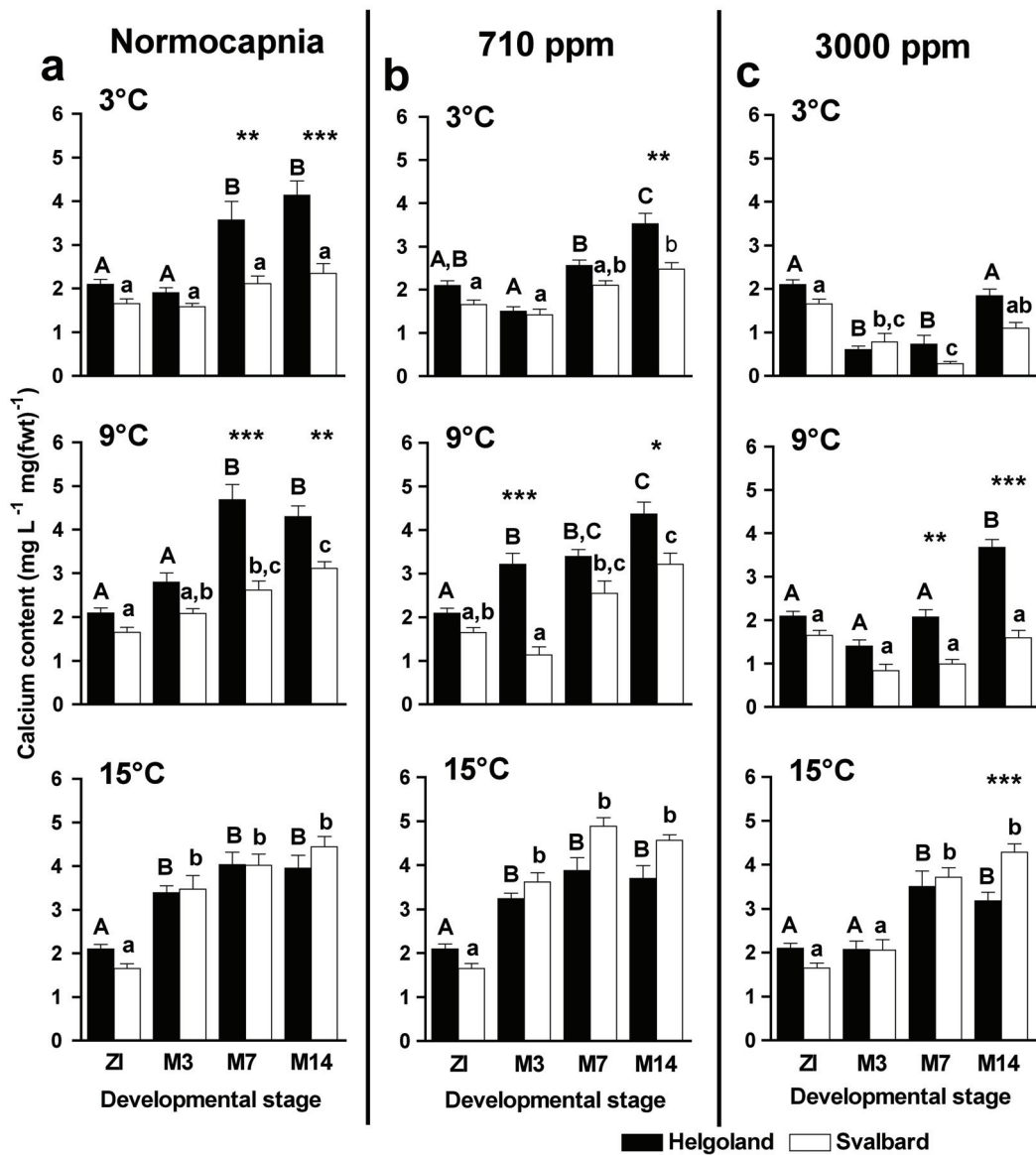


Fig. 1 Comparison of two populations of *Hyas araneus*, (Helgoland, black; Svalbard, white) with respect to calcium content of Zoea I (ZI) and Megalopa after 3 (M3), 7 (M7) and 14 days (M14) reared at 3, 9 and 15°C under normocapnic conditions (a), 710 ppm (b) and 3000 ppm CO₂ (c). Significant differences between populations are indicated by asterisks, within the Helgoland population by capital letters, and within the Svalbard population by small letters: three-way ANOVAs of each CO₂ condition, N = 6-13.

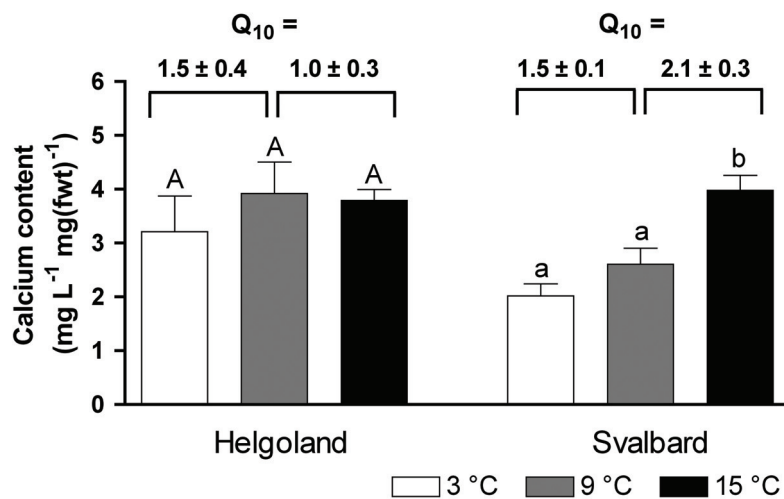


Fig. 2 Comparison of pooled megalopae of *Hyas araneus* from Helgoland and Svalbard reared at 3°C (white), 9°C (grey) and 15°C (black) under normocapnic conditions and associated Q_{10} values between 3-9°C and 9-15°C of each population. Significant differences within each population are indicated by capital letters for the one from Helgoland and by small letters for the one from Svalbard: one-way ANOVA (N = 3).

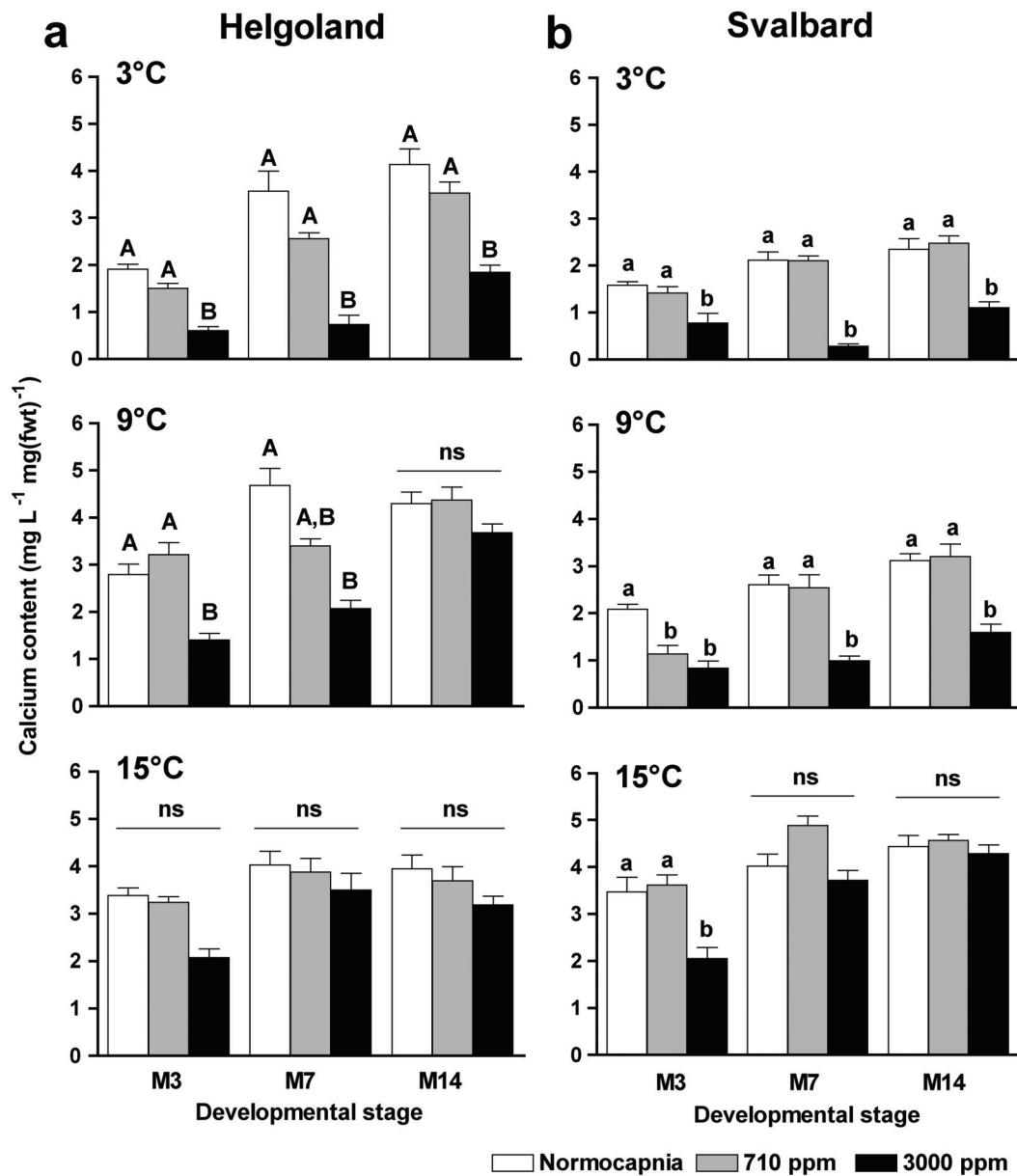


Fig. 3 Calcium content of Helgoland (a) and Svalbard (b) megalopa of *Hyas araneus* after 3 (M3), 7 (M7) and 14 days (M14) reared at 3, 9 and 15°C under normocapnia (white), 710 ppm CO₂ (grey), 3000 ppm CO₂ (black). Significant differences within populations are indicated by capital (Helgoland) or small letters (Svalbard): three-way ANOVA, N = 6-13.

Publikation IV

**Characterization of the Na⁺/K⁺-ATPase in gills of the spider crab *Hyas araneus*
(L.) from different latitudes (54° and 79°)**

K Walther, T Brenneis, M Lucassen, HO Pörtner

2010

(in Bearbeitung)

SHORT COMMUNICATION

Characterization of the Na⁺/K⁺-ATPase in gills of the spider crab *Hyas araneus* (L.) from different latitudes (54° and 79°N)

Kathleen Walther, Tina Brenneis, Magnus Lucassen, Hans O. Pörtner

Alfred-Wegener-Institute for Polar and Marine Research, Department Integrative Ecophysiology, Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven, Germany

*Corresponding author: Kathleen.Walther@awi.de

Abstract

Gills have their main function in ion regulation and gas exchange. A key enzyme for ion regulative processes is the Na^+/K^+ -ATPase located in the basolateral membrane of gill epithelia cells. For a characterization of its functionality and thermal sensitivity gills of the spider crab *Hyas araneus* of two different populations, Helgoland (southern North Sea, 54°N) and Svalbard (North Atlantic, 79°N), have been analysed. Activity levels and protein contents of Na^+/K^+ -ATPase were measured in 6 gill arches at 5 and 10 °C. Na^+/K^+ -ATPase activities in crabs from Svalbard measured at 5 °C were similar to those in crabs from Helgoland measured at 10 °C. Warming to 10 °C of the Na^+/K^+ -ATPase extracted from Svalbard specimens resulted in a fourfold increase in activity whereas cooling to 5 °C of the Na^+/K^+ -ATPase (s.o.) extracted from crabs in Helgoland caused a reduction in activity by one third. This resulted in a significantly higher Q_{10} value for the Svalbard animals population compared to the one from Helgoland. Na^+/K^+ -ATPase activity showed no significant differences between different gill arches within the same population, but displayed strong differences between populations at each temperature. Immunological quantification of Na^+/K^+ -ATPase showed similar protein contents in all but higher levels in gill arch number 6 of the Svalbard population, indicating some intraspecific ion regulatory differentiation. In conclusion, Na^+/K^+ -ATPase activity and content are modified, which may support the adaption of *Hyas araneus* populations to their specific habitat temperatures.

Keywords: *Hyas araneus*, Na^+/K^+ -ATPase activity, Helgoland, Svalbard

Introduction

Crustacean gills are multifunctional organs contributing to gas exchange, osmolyte transport, nitrogenous waste excretion, volume and acid-base regulation (Lucu and Towle 2003). In euryhaline decapods posterior and anterior gills comprise different cell types. The posterior gills are specialized in osmoregulatory ion transport (Goodman and Cavey 1990). Tissues involved in ion-transport typically display highly developed epithelial cells with basolateral and apical membrane infoldings and a dense distribution of mitochondria (Compère et al. 1989). The anterior gills, which are specialized in gas exchange are composed of flattened, poorly differentiated cells (Compère et al. 1989, Péqueux 1995). Posterior gill cells of euryhaline crabs display higher Na^+/K^+ -ATPase activities than anterior gill cells (Neufeld et al 1980, Siebers et al. 1982, Corotto and Holliday 1996).

In contrast to euryhaline crabs, stenohaline crabs (*Cancer pagurus*, *Astacus leptodactylus*, *Orconectes limosus*, *Macropipus puber*) show no differences in Na^+/K^+ -ATPase activities between posterior and anterior gill cells (Winkler 1986, Harris and Bayliss 1988). Many stenohaline decapods are osmoconformers, the osmolality of their internal medium changes in proportion to that of the external medium. They display a weak capability to hyperregulate mainly depending on the capacity of intracellular regulation (Anger 2001).

Na^+/K^+ -ATPase actively exchanges three sodium ions for two potassium ions across the basolateral membrane, thus establishing an electrochemical gradient across the cell membrane (Hilden & Hokin 1975, Lucu and Towle 2003). The Na^+/K^+ -ATPase consists of three subunits, the α -, β - and γ -subunits (Horisberger et al. 1991, Petersen et al. 1982, Therein and Blostein 2000, Towle et al. 2001). In crustaceans two isoforms of the α subunit has been described, e.g. in *Callinectes sapidus*, which provides the catalytic function by the binding and hydrolysis of ATP (Towle et al. 2001).

Na^+/K^+ -ATPase plays an important role in ion regulation by establishing a Na^+ gradient and a membrane potential, which provides a driving force for other transporters like $\text{Na}^+/\text{H}^+/\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger, Na^+/H^+ exchanger, or $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter involved in the organism's response to changing environmental conditions (Mantel 1985, Henry and Wheatly 1992, Pörtner et al. 2004). In mammalian cells Na^+/K^+ -ATPase consumes about 20 - 30 % of the ATP produced and thus represents a major component of the energy budget. In transepithelial cells an even larger fraction can be

anticipated. Thus, the function of this enzyme has to be tightly regulated at all levels of organization to avoid dissipation of energy (Pörtner et al. 1998, Deigweiher et al. 2008).

Recent studies of Na⁺/K⁺-ATPase in crustaceans at both, protein and functional levels have been conducted with a focus on the osmoregulative capacity of crustaceans (Neufeld et al. 1980, Charmantier 1998, Castilho et al. 2001). Here, we investigated the capacities of this enzyme with regard to its possible differentiation in populations living along a latitudinal temperature cline. The cold-eurythermal and stenohaline spider crab *Hyas araneus* L. is distributed from the temperate southern North Sea (near Helgoland, Germany) to the sub-Arctic waters of Svalbard (Norway) (Christiansen 1969). The temperature in the southern North Sea varies seasonally between 3 °C and 18 °C (Wiltshire & Manly 2004). In contrast, the temperatures near Svalbard range from 0 °C to 6 °C (Svendsen et al. 2002). Adult individuals live on stony, sandy and soft bottoms from <1 m down to 360 m, most commonly at depths less than 50 m (Christiansen 1969).

In this study, the activity and protein content of Na⁺/K⁺-ATPase in the gills of *Hyas araneus* were investigated in order to determine how the capacity of this enzyme contributes to the acclimatization or adaptation to its respective habitat temperature. The results may help to make projections about the capability of a population to deal with environmental change including future global warming.

Material and methods

Animals

Adult males of *Hyas araneus* were dredged at 30 to 50 m depth near Helgoland (German Bight, North Sea, 54° 11'N, 7° 53'O) and were caught by divers in the Kongsfjorden (Svalbard, Norway, 78° 55'N, 11° 5'O), respectively. Animals were transported to the Alfred-Wegener-Institute, Bremerhaven (Germany) and kept in flow-through seawater aquaria, Helgoland males at 10 °C and Svalbard males at 5 °C (Carapax length 60.9 ± 4.3 mm), under a 12 h day-night cycle. The animals were fed twice a week with *Mytilus edulis*. Animals were killed, and gill arches were dissected and excess water was removed by placing the arches briefly on tissue paper. After instantaneously freezing in liquid nitrogen the arches were stored at -80 °C until further analysis.

Protein activity and quantification

Frozen gill tissue samples were prepared for Na⁺/K⁺-ATPase activity measurements and protein quantification after Deigweiher et al. (2008). Starting from the posterior, gill arches were numbered from 1 to 5 and only gills from the left side were used. Gill arches number 6 were used from both sides. The Na⁺/K⁺-ATPase activities of the crude extracts were measured in each gill arch from both *H. araneus* populations at 5 and 10 °C. Following Deigweiher et al. (2008), the reaction was started by adding the sample homogenate. The oxidation of NADH coupled to the hydrolysis of ATP was detected spectrophotometrically in a spectrometer (DU7400i, Beckman Coulter) over a period of 10 min, by monitoring the decrease in extinction at $\lambda = 339\text{nm}$. The fraction of Na⁺/K⁺-ATPase activity in total ATPase (TA) activity was determined by the addition of 5 mM ouabain. Enzyme activity was calculated using an extinction coefficient for NADH of $\epsilon = 6.31 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and given as micromoles ATP consumed per hour and gram fresh weight (fwt).

For immunoblotting of Na⁺/K⁺-ATPase 25 μl membrane extracts (see above) were used as described earlier (Deigweiher et al. 2008). The monoclonal antibody $\alpha 5$, raised against the chicken Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit (developed by D. F. Fambrough; John Hopkins University, Baltimore, MD) was employed. Protein signals were visualized by using the ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare, Munich, Germany) and recorded by a LAS-1000 charge-coupled device camera (Fuji, Tokyo, Japan). Signal intensity was calculated using AIDA Image Analyzer software (ver. 3.52, Raytest, Straubenhardt, Germany). The Na⁺/K⁺-ATPase protein content was given in arbitrary units per gram fresh weight (fwt).

Statistical analysis

Statistical significance with data from all gill arches pooled together the effect of temperature (5, 10 °C) and origin of population (Helgoland, Svalbard) on the enzyme activity of the crabs was tested by one-way ANOVA ($p < 0.05$). Significant differences between individual groups were identified through pairwise comparisons (Tukey's post-hoc test). Differences in the Q_{10} values between populations (Helgoland, Svalbard) were tested by pairwise comparison with students t-test for unpaired data sets. The homogeneity of variances was confirmed with Bartlett's test ($p > 0.05$) and normal distribution was checked by Kolmogorov-Smirnov-test ($p > 0.05$). In order to test for the effect of gill arches and population on the enzyme expression and activity individual

pairwise students t-test ($p < 0.05$) were applied. In all cases data were log transformed to meet the assumptions of normal distribution (Kolmogorov-Smirnov-test, $p > 0.05$) and homogeneity of variances (Bartlett's test, $p > 0.05$). Graphs were developed using GraphPad Prism (Version 4, GraphPad Software Inc.). Values are given as means \pm 1 SE. All analyses were tested at the 0.95 % confidence level.

Results

Functional capacities

The Na^+/K^+ -ATPase activities in the gills of *Hyas araneus* from Helgoland and Svalbard were measured at 5 °C and 10 °C (Fig. 1). Significant differences were detected between rates measured at 10°C in animals from Svalbard compared to those measured at 5 and 10°C in animals from Helgoland and at 5 °C in those from Svalbard (one-way ANOVA, $p < 0.05$). The Q_{10} of *H. araneus* between 5 and 10 °C differed between the populations, $Q_{10} = 7.7 \pm 1.3$, for Helgoland animals and $Q_{10} = 15.7 \pm 2.7$, for Svalbard animals, calculated from the Na^+/K^+ -ATPase activity of each gill arch and individual. Q_{10} values were significantly different (students t-test, $p < 0.05$).

Figure 2 depicts the Na^+/K^+ -ATPase activities determined in each gill arch of *Hyas araneus* from Helgoland and Svalbard at 5 °C (a) and 10 °C (b). At 5 °C the enzyme activity in the gills of Svalbard animals was on average, 43 % higher than in animals from Helgoland. When comparing individual arches the increment in arch number 4 was significant (students t-test, $p < 0.05$) (a). At 10 °C, Na^+/K^+ -ATPase activities in the gills of animals from Svalbard were generally about 63 % higher than found in animals from Helgoland. Here, the increase was significant in gill arch number 2 (students t-test, $p < 0.05$) (b).

Protein quantity

By use of the $\alpha 5$ -antibody a specific protein band was detected in the membrane fraction of gill extracts with a size of about 105 kDa, which is in good agreement with the prospected size of the α subunit in crustaceans. The Na^+/K^+ -ATPase protein content in gills of *Hyas araneus* from Helgoland and Svalbard is shown in Figure 3. Protein levels were similar in populations from Helgoland and Svalbard. Protein content of gill arch number 6 of animals from Svalbard was significantly enhanced compared to the other gill samples of this population (students t-test, $p < 0.05$).

Discussion

The activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the gills of *Hyas araneus* responds to temperature change and differs between the populations when assayed at 5 and 10 °C (Fig. 1). The activity level of Na⁺/K⁺-ATPase overall ranged from about 0.68 ± 0.10 to 1.34 ± 0.22 μmol/(h*g(fwt)) at 5 °C and 1.66 ± 0.19 to 4.39 ± 0.50 μmol/(h*g(fwt)) at 10 °C (Fig 1,2). These findings are consistent with values found for other non-osmoregulating crustaceans like *Cancer pagurus* and *Nephrops norvegicus* (1.05 - 1.79 μmol/(h*g(fwt))) (Harris and Bayliss 1988). In contrast, osmoregulating crustaceans display higher Na⁺/K⁺-ATPase activity values (*Uca pugnax*: about 10.0 - 40.0 μmol/(h*g(fwt)) (Holliday 1985), *Carcinus maenas*: about 2.6 - 11.2 μmol/(h*g(fwt)) (Harris and Bayliss 1988), *Hemigrapsus nudus*: about 5.0 - 30.0 μmol/(h*g(fwt)) (Corotto and Holliday 1996)), depending on the salinity ranges experienced. Thus, the Na⁺/K⁺-ATPase capacity of *Hyas araneus* is in agreement with a stenohaline, osmoconform physiology.

Na⁺/K⁺-ATPase activity is similar between the populations at their particular acclimation temperature (5 °C for animals from Svalbard (1.34 ± 0.22 μmol/(h*g(fwt))) and 10 °C for those from Helgoland (1.66 ± 0.19 μmol/(h*g(fwt))) respectively). As habitat temperatures range from 0 to 6 °C for *H. araneus* from Svalbard (Svendsen et al. 2002) and 3 to 18 °C for *H. araneus* from Helgoland (Wiltshire and Manly 2004), these temperatures are well within the natural range. For the Helgoland population 10 °C represents the optimum temperature (Walther et al. 2009).

Gill Na⁺/K⁺-ATPase in *Hyas araneus* from Helgoland measured at both 5 and 10 °C displayed a decrease in activity by about 40 % at 5 °C (Fig. 1). Whereas the enzyme activity in Svalbard crabs resulted in a quadruplication after warming from 5 to 10 °C (Fig. 1), showing the high thermal sensitivity of the enzyme. Thus, Na⁺/K⁺-ATPase activities in both populations displayed different thermal sensitivities, evidenced by the significant differences of the Q₁₀ values (Fig. 1), indicating different temperature adaptations of the animals to their respective habitat temperature. Comparison of the measured Q₁₀ values to literature data (*Macrobrachium rosenbergii*: Q₁₀ = 2.34 (15 - 30 °C) (Stern et al. 1984); *Chasmagnathus granulata*: Q₁₀ = 3.46 (10 - 20 °C) (Castilho et al. 2001)) shows that these Q₁₀ values are relatively high. High Q₁₀ values reflect a high Arrhenius activation enthalpy and strong temperature dependent control of transmembrane ion flux.

In addition, the Q_{10} value was higher in *H. araneus* from Svalbard than in those from Helgoland. In many cases, enzymes of cold-adapted animals have low Q_{10} values, which is energetically more efficient at low temperature. Some of these examples (Fields and Somero, 1997, Sokolova and Pörtner 2003, Sommer and Pörtner 2004) may apply to cold adapted eurytherms. Lower activation energies, which correlate with low Q_{10} values of proteins from cold-adapted species are caused by a higher degree of conformational flexibility than proteins of warm-adapted species (Somero 2002, Pörtner et al. 2005). In contrast, our data show high Q_{10} values of cold-adapted animals from Svalbard *Hyas araneus*. Similar Pörtner et al. (2000) proposed high Q_{10} values due to high activation energies in cold-adapted Antarctic animals responsible for the high sensitivity for warming and thus stenothermy in Antarctic ectotherms.

Studies on *Petrolisthes* species show different temperature sensitivities of the Na^+/K^+ -ATPase depending on their original intertidal habitat. Increased temperatures up to 40 °C lead to a reduction of Na^+/K^+ -ATPase activity in crabs with a lower thermal tolerance limit at 20 °C compared to crabs with higher thermal tolerance. Here the reduction of enzyme activity occurs at 30 °C (Stillman 2002). The differences between the two populations of *Hyas araneus* in Na^+/K^+ -ATPase activity may thus be related to the differences in temperature in their original habitat. The higher thermal sensitivity of the Na^+/K^+ -ATPase of the Svalbard *H. araneus* likely relate to the smaller temperature range at Svalbard and reflect a narrowing of the thermal window. At high temperatures the maintenance of ion gradients may become energetically costly, if no compensatory reduction of excess capacities takes place. Depending on whether this character is permanent or plastic and subject to modification by acclimatization, this may co-define the sensitivity to future climate change which may involve a temperature rise to 10 °C at the Svalbard location according to future scenarios (IPCC 2007).

The comparison between Na^+/K^+ -ATPase activities and the expression of this enzyme in the gill arches of both populations illustrates differences in activity despite similar enzyme contents (Fig. 2, 3). The data reflect a different thermal sensitivity of the enzyme, which can be related to posttranslational modifications like phosphorylation or glycosylation of the α -subunit (Lovett et al. 2006). Alternatively, membrane composition interacts with the functional properties of Na^+/K^+ -ATPase and may, upon modification affect the kinetic properties of the enzyme (Wodtke 1981). The 6 gill arches of *Hyas araneus* did not differ with respect to Na^+/K^+ -ATPase activity within a population. It therefore seems that gill arches of *Hyas araneus* are not specialized with

respect to gas exchange and ion/pH regulatory functions, similar to other osmoconform crustaceans like *Orinectes limosus*, *Astacus leptodactylus*, *Cancer pagurus*, or *Nephrops norvegicus* (Winkler 1986, Harris and Bayliss 1988). Despite, some differentiation became visible in *H. araneus*, as gill Na⁺/K⁺-ATPase activities in gill arches 2 and 4 were distinctly different between the two populations at 5 °C and 10 °C assay temperature (Fig. 2).

The question arises how the differences between populations have been established at the molecular level. Therefore, protein contents were determined using Na⁺/K⁺ ATPase specific antibodies. The α5 antibody binds to the α-subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase (Horisberger et al. 1991, Towle et al. 2001). Because of the broad species range, where this antibody can be used to detect Na⁺/K⁺ ATPase, differences in the expression of distinct isoforms or post-translational modifications are unlikely to be detected. Immunoblotting of the Na⁺/K⁺-ATPase shows differences regarding the anterior gill arch (no. 6) compared to the other gills (Fig. 3) with a significant increase in Na⁺/K⁺-ATPase protein content, whereas activity levels remain similar, indicating some intraspecific ion regulatory differentiation. These differences may be associated with some cold compensation of ion regulation and contrast the patterns in euryhaline crabs where the posterior gills differentiate and specialize on regulatory functions (Neufeld et al. 1980, Siebers et al. 1982, Corotto and Holliday 1996).

As a corollary, the present study has demonstrated specific differences in the ion regulatory capacity of both populations, which may relate to their sensitivity to warming. At unchanged protein content functional capacities were higher in the *Hyas araneus* population from Svalbard. The high thermal activation of Na⁺/K⁺ ATPase in both populations suggests that excess capacities of the enzyme will need to be down-regulated upon warm exposure. Since the Arctic population was already acclimated close to the summer temperature maximum, it seems questionable whether further reduction in capacity is possible. Thus, the regulation of Na⁺/K⁺-ATPase functions may contribute to shaping energetic constraints in response to warming, and thereby affect the geographical distribution of populations and species.

Acknowledgements. This work is a contribution to the "European Project on Ocean Adification" (EPOCA) which received funding from the European Community's Seventh Framework programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 211384. EPOCA is endorsed by the International Programme LOICZ. Supported by the Mar Co Pol I research program of the Alfred-Wegener-Institute and the BIOACID program of the Federal Ministry of Research, Germany. We would like to thank Katharina Michael for excellent technical assistance.

References

- Anger K (2001) The biology of decapod crustacean larvae. Crustacean Issue 14. A.A. Balkema Publishers, Swets and Zeitlinger, Lisse, pp. 1-420
- Castilho PC, Martins I A, Bianchini A (2001) Gill Na^+ , K^+ -ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). J Exp Mar Biol Ecol 256: 215-227
- Charmantier G (1998) Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. Inv Rep Dev 33:177-190
- Christiansen ME (ed) (1969) Crustacea Decapoda Brachyura. In: Marine Invertebrates of Scandinavia. No. 2, Universitetsforlaget, Oslo
- Compère P, Wanson S, Péqueux A, Gilles R, Goffinet G (1989) Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the external salinity. Tissue Cell 21: 299-318
- Corotto FS, Holliday CW (1996) Branchial Na, K-ATPase and Osmoregulation in the Purple Shore Crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). Comp Biochem Physiol 113: 361-368
- Deigweiher K, Koschnik N, Pörtner H-O, Lucassen M (2008) Acclimation of ion regulatory capacities in gills of marine fish under environmental hypercapnia. Am J Phys Reg Int Comp Physiol 295 (5): R1660-1670
- Fields PA, Somero GN (1997) Amino acid sequence differences cannot fully explain interspecific variation in thermal sensitivities of gobiid fish A_4 -lactate dehydrogenases (A_4 -LDHS). J exp Biol 200: 1839-1850
- Goodman SH and Cavey MJ (1990) organization of a phyllobranchiate gill from the green shore crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). Cell Tissue Res

260: 495-505

- Harris RR and Bayliss D (1988) Gill (Na^+ + K^+)-ATPases in decapod crustaceans: distribution and characteristics in relation to Na^+ regulation. *Comp Biochem Physiol* 90A (2): 303-308
- Henry RP and Wheatly MG (1992) Interaction of respiration, ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Am Zool* 32: 407-416
- Hilden S, Hokin LE (1975) Active potassium transport coupled to active sodium transport in vesicles reconstituted from purified sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase from the rectal gland of *Squalus acanthias*. *J Biol Chem* 250: 6296-6303
- Holliday CW (1985) Salinity-induced changes in gill Na,K-ATPase activity in the mud fiddler crab, *Uca pugnax*. *J Exp Zool* 233:199-208
- Horisberger J-D, Lemas V, Kraehenbühl J-P, Rossier BC (1991) Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol* 53:565-584
- IPCC (2007) *Climate Change 2007, Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge
- Lovett DL, Verzi MP, Burgents JE, Tanner CA, Glomski K, Lee JJ, Towle DW (2006) Expression profiles of Na^+ , K^+ -ATPase during acute and chronic hypo-osmotic stress in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biol Bull* 211: 58-65
- Lucu C and Towle DW (2003) Na^+ + K^+ -ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp Biochem Physiol A* 135: 195-214
- Mantel LH (1985) Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. *Am Zool* 25: 253-263
- Neufeld GJ, Holliday CW, Pritchard JB (1980) Salinity adaption of gill Na,K-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J Exp Zool* 211: 215-224.
- Péqueux A (1995) Osmotic regulation in crustaceans. *J Crust Biol* 15 (1): 1-60
- Peterson GL, Churchill L Fisher JA and Hokin LE (1982) Structural and biosynthetic studies on the two molecular forms of the (Na^+ + K^+)-activated adenosine triphosphatase large subunit in *Artemia salina* Nauplii. *J Exp Zool* 221: 295-308
- Pörtner HO, Hardewig I, Sartoris FJ, Dijk P van (1998) Energetic aspects of cold adaptation critical temperatures in metabolic, ionic and acid-base regulation? *Cold Ocean Physiology* (HO Pörtner, R Payle, eds.), Cambridge University Press 88-120
- Pörtner HO, Van Dijk PLM, Hardewig I, Sommer A (2000) Levels of metabolic cold

- adaptation: tradeoffs in eurythermal and stenothermal ectotherms. In: Antarctic Ecosystems: models for wider ecological understanding. Eds. Davison W, Howard-Williams C, Broady P. Caxton Press, Christchurch New Zealand, pp.109-122
- Pörtner HO, Langenbuch M, Reipschläger A (2004) Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *J Oceanography* 60: 705-718
- Pörtner HO, Lucassen M, Storch D (2005) Metabolic biochemistry: its role in thermal tolerance and in the capacities of physiological and ecological function. *The Physiology of Polar Fishes* (AP Farrell, JF Steffensen, eds.). *Fish Phys* 22: 79-154
- Siebers D, Leweck K, Markus H, Winkler A (1982) Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. *Mar Biol* 69: 37-43
- Somero GN (2002) Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integ Comp Biol* 42: 780-789
- Sommer A, Pörtner HO (2004) Mitochondrial function in seasonal acclimatization versus latitudinal adaptation to cold in the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Physiol Biochem Zool* 77: 174-186
- Sokolova IM, Pörtner HO (2003) Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. *J Exp Biol* 206: 195-207
- Stern S, Borut A, Cohen D (1984) Characterization of Na-K ATPase from the gills of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Comp Biochem Physiol* 79:47-50
- Stillman JH (2002) Causes and Consequences of thermal tolerance limits in rocky intertidal porcelain crabs, genus *Petrolisthes*. *Integ Comp Biol* 42: 790-796
- Svendsen H, Breszczyńska-Møller A, Hagen JO, Lefauconnier B, Tverberg V, Gerland S, Ørbæk JB, Bischof K, Papucci C, Zajackowski M, Azzolini R, Bruland O, Wiencke C, Winther J-G, Dallmann W (2002) The physical environment of Kongsfjorden-Krossfjorden, an Arctic fjord system in Svalbard. *Polar Res* 21 (1): 133-166
- Therien AG and Blostein R (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol* 279: C541-C566
- Towle DW, Pausen RS, Weihrauch D, Kordylewski M, Salvador C, Lignot J-H,

- Spanings-Pierrot C (2001) Na⁺+K⁺-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of α -subunit mRNA and protein. J Exp Biol 204: 4005-4012
- Walther K, Sartoris FJ, Bock C, Pörtner HO (2009) Impact of anthropogenic ocean acidification on thermal tolerance of the spider crab *Hyas araneus*. Biogeosciences 6: 2207-2215
- Wiltshire KH, Manly BFJ (2004) The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: phytoplankton response. Helgol Mar Res 58: 269-273
- Winkler A (1986) Effects of inorganic sea water constituents on branchial Na-K-ATPase activity in the shore crab *Carcinus maenas*. Mar Biol 92: 537-544
- Wodtke E (1981) Temperature adaptation of biological membranes. Compensation of the molar activity of cytochrome c oxydase in the mitochondrial energy-transducing membrane during thermal acclimation of the carp (*Cyprinus carpio* L.). Biochim Biophys Acta 640: 710-720

Figures

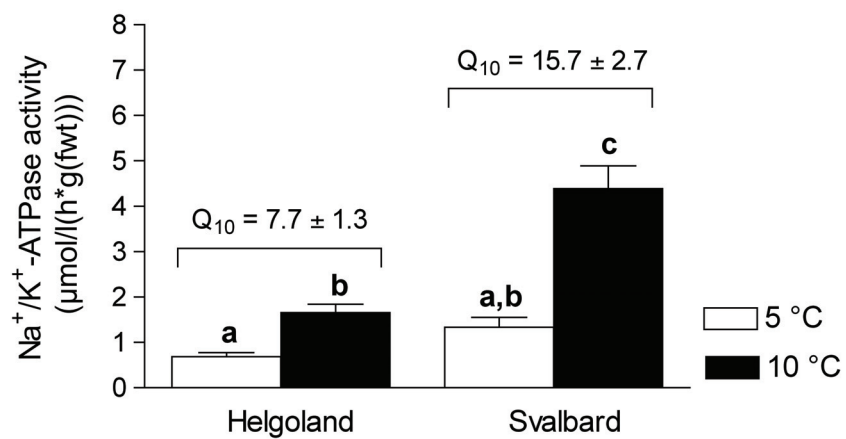


Fig. 1. Na⁺/K⁺-ATPase activities and associated Q₁₀ values of *Hyas araneus* from Helgoland and Svalbard in the temperature range between 5 °C (white) and 10 °C (black). Letters indicate significant differences (one-way ANOVA, $p < 0.001$, $N = 5$), for Q₁₀ (t-test, $p < 0.05$).

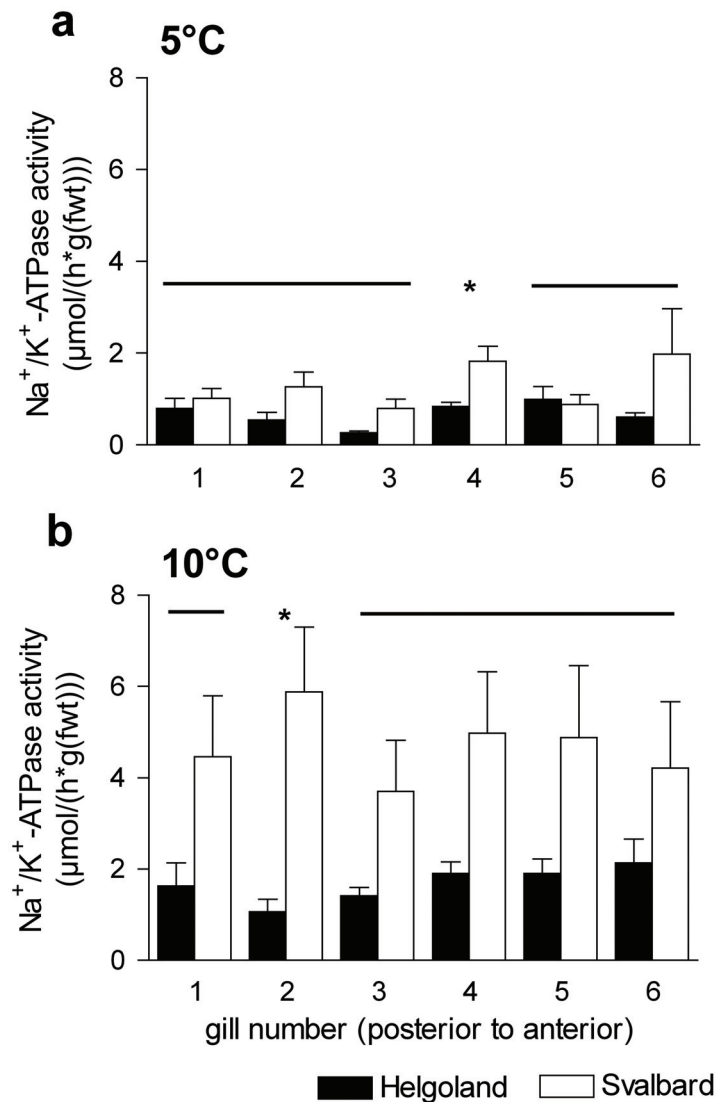


Fig. 2. Na^+/K^+ -ATPase activity of *Hyas araneus* from Helgoland (black) and Svalbard (white) measured per gill arch at 5°C (a) and 10°C (b). (a) The asterisk indicates a significant increase of enzyme activity in specimens from Svalbard in gill number 3. (b) The asterisk indicates a significant increase of enzyme activity in specimens from Svalbard in gill number 2. (N = 5, $p < 0.05$).

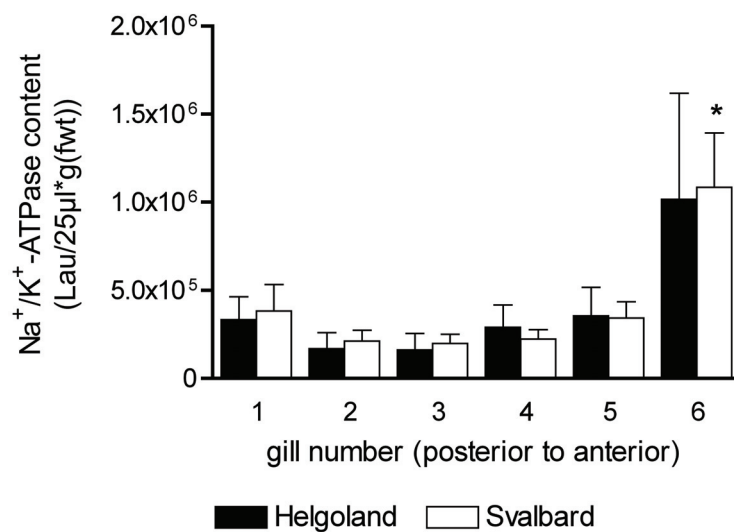


Fig. 3. Na⁺/K⁺-ATPase protein content in the gill arches of *Hyas araneus* from Helgoland (black) acclimated to 10 °C and Svalbard (white) acclimated to 5 °C. The asterisk indicates a significant increase of protein content in specimens from Svalbard, in gill number 6 compared to other gill arches. (students t-test, N = 5, $p < 0.05$).

4. Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden die Temperaturtoleranzgrenzen der Seespinne *Hyas araneus* und die Auswirkung von Ozeanversauerung und -erwärmung auf die Anpassungsfähigkeit der hier untersuchten Populationen von adulten und larvalen Stadien erörtert. Darüber hinaus werden Tätigkeitsfelder für zukünftige Arbeiten zur Temperaturtoleranz von *Hyas araneus* vorgestellt und die künftige Verbreitung der Art im Nordostatlantik diskutiert.

4.1 Temperaturtoleranz von adulten *Hyas araneus* im Klimawandel

4.1.1 Temperaturtoleranzfenster

Die Untersuchung zur Temperaturtoleranz der Seespinne *Hyas araneus* (Publikation I) erfolgte angelehnt an die Studien von Frederich & Pörtner (2000) an der Seespinne *Maja squinado*. Entsprechend wurden die beiden temperatursensitiven Parameter Sauerstoffpartialdruck in der Hämolymphe (P_{eO_2}) und die Herzrate gemessen. Ausgehend von einer natürlichen Habitatterperatur von 3 bis 18 °C an der südlichsten Verbreitungsgrenze von *H. araneus* in den Gewässern um Helgoland sollte die Bestimmung der Temperaturtoleranz Aufschluss über mögliche Konsequenzen der Ozeanerwärmung und der erhöhten anthropogenen CO₂-Emission auf diese Art geben.

In früheren Studien an Crustaceen wurde die Temperaturtoleranz durch Messungen der Herzrate ermittelt, welche beim Erreichen der oberen kritischen Temperatur sank (Stillman & Somero 1996, Zainal et al. 1992, Frederich & Pörtner 2000, Worden et al. 2006). Dieser Toleranzbereich kann durch veränderte Umweltparameter wie Salinität, Ionenkonzentration oder Anoxie (Sauerstoffmangel) beeinflusst werden (DeFur & Mangum 1979, Frederich et al. 2000, Zainal et al. 1992). Zur Untersuchung der Temperaturtoleranz der *Hyas araneus* Population vor Helgoland wurden die Tiere zudem in einem akuten Temperaturfenster von 0 bis 25 °C verschiedenen CO₂-Konzentrationen (Normokapnie: 380 ppm CO₂ und Hyperkapnie: 710 ppm und 3000 ppm CO₂) ausgesetzt. Der aerobe Optimalbereich, welcher durch den exponentiellen Verlauf der Herzrate charakterisiert ist und durch die Pejusa-

Temperaturen eingegrenzt wird, konnte für die Helgoländer Population von 6 bis 12 °C ermittelt werden. Mit Erreichen der Pejus-Temperaturen beginnt eine Diskrepanz aus dem Sauerstoffbedarf der Zellen und der Sauerstoffbereitstellung durch die Ventilation und Herztätigkeit. Bei einer akuten Erwärmung bis 25 °C blieb die Herzrate der Krebse unter normokapnischen Bedingungen annähernd konstant, während der Sauerstoffgehalt in der Hämolymphe dagegen abfiel. Dies ist mit dem gesteigerten Sauerstoffbedarf der Zellen bei zunehmender Temperatur zu erklären. Die Herzrate wird erhöht, um den Sauerstoffbedarf zu decken. Wird schließlich die obere kritische Temperatur erreicht, welche zur Anaerobiose führt, sinkt die Herzrate (Frederich & Pörtner 2000, Frederich et al. 2000). Ähnlich interpretierbare Grenztemperaturen wurden auch von Taylor (1982) und Stillman & Somero (1996) beschrieben. Bis zur Temperatur von 25 °C sank die Herzrate nicht. Somit wurde die obere kritische Temperatur unter normokapnischen Bedingungen noch nicht erreicht. In zukünftigen Untersuchungen sollte die Messtemperatur weiter erhöht werden, um die obere kritische Temperatur von *H. araneus* von Helgoland auch unter Normokapnie zu ermitteln.

Unter hyperkapnischen Bedingungen veränderte sich die Herzrate während der Erwärmung auf 25 °C. Die Herzrate sank, und die obere kritische Temperatur wurde bei einer CO₂-Konzentration von 710 ppm bei 23.5 °C erreicht. Bei einer weiteren CO₂-Erhöhung auf 3000 ppm fiel die Herzrate schon bei 21.1 °C. Der aerobe Optimalbereich unter hyperkapnischen Bedingungen lag, ebenso wie bei normokapnischen Bedingungen, bei 6 bis 12 °C. Bei Erreichen der Pejus-Temperatur minimiert sich die aerobe Aktivität der Tiere zunehmend, wie schon in Untersuchungen an Fischen (Mark et al. 2002, Lannig et al. 2004, Pörtner & Knust 2007) oder Schnecken und Muscheln (Peck et al. 2009, Morley et al. 2009b) gezeigt werden konnte. Die geringere Sauerstoffverfügbarkeit im Organismus wirkt sich negativ auf die physiologische Prozesse wie den Stoffwechsel, die Aktivität oder das Wachstum und auf lange Sicht auch auf die Fitness der Tiere aus (Sokolova & Pörtner 2003, Jansen et al. 2007, Pörtner & Knust 2007, Peck et al. 2009, Morley et al. 2009b). Aufgrund solcher Leistungslimitierungen kann es bei klimatischen Veränderungen wie zum Beispiel einer Erwärmung zu geographischen Verbreitungsverschiebungen von Individuen kommen. Dies wurde bei Invertebraten und Fischen bereits beschrieben (Frank et al. 1990, Jansen et al. 2007, Wetthey & Woodin 2008, Pörtner & Farrell 2008, Pörtner 2010). Der Pejus-Bereich, und damit die Verminderung der aeroben Aktivität, beginnt bei *H. araneus* ab 12 °C. Das frühere Erreichen der oberen kritischen Temperatur unter Hyperkapnie im

Vergleich zur Normokapnie zeigt, dass die Ozeanversauerung den Pejus-Bereich der Seespinne *Hyas araneus* von Helgoland (54°N) verringert und ihren physiologischen Temperaturtoleranzbereich weiter einengt. Wie Wiltshire & Manly (2004) feststellen konnten, liegt die Habitattemperatur zwar im Mittel bei bis zu 18 °C, in den Sommermonaten können jedoch auch Maxima von 20 °C erreicht werden. Hinzu kommt, dass sich die Nordsee in der Helgoländer Reede in den letzten 40 Jahren um 1.1 °C erwärmt hat. Zukünftige Prognosen beschreiben eine weiter fortschreitende Erwärmung von 2.5 °C bis zum Jahr 2100 bei einer CO₂-Konzentration von 650 bis 750 ppm (Abb. 1.1.4, IPCC 2001). In der Region um Helgoland könnten in den Sommermonaten somit bis zu 22.5 °C erreicht werden. Unter dem Szenario von 710 ppm CO₂ befänden sich die Krebse in 100 Jahren in Sommermonaten schon nahe an ihrer oberen kritischen Temperatur. Die beschriebenen physiologischen Einschränkungen des oberen Toleranzbereiches der *H. araneus* von Helgoland aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen werden sich vermutlich auch auf die Besiedlung der Art in dieser Region auswirken, wie es bei der Seepocke *Semibalanus balanoides* (Wetthey & Woodin 2008) oder der Muschel *Macoma balthica* (Jansen et al. 2007) bereits beobachtet werden konnte. Bei einer weiteren Erwärmung der Region um Helgoland wird diese Art vermutlich in kältere, nördlichere Gebiete abwandern (siehe Kapitel 4.3), um den Temperaturen des Pejus- und kritischen Bereiches im Habitat und somit einer Leistungslimitierung zu entgehen.

Die Verbreitung von *Hyas araneus* erstreckt sich von der hier untersuchten Region um Helgoland bis in die Sub-Arktischen Gebiete um Svalbard. Diese beiden Regionen unterscheiden sich vor allem in ihrer Habitattemperatur. In den Gebieten um Svalbard herrschen Habitattemperaturen von lediglich 0 bis 6 °C (Svendsen et al. 2002), das durchschnittliche Maximum ist also um 12 °C kälter als jenes in den Gebieten um Helgoland. Im Hinblick auf eine zunehmende Ozeanerwärmung und -versauerung, vor allem auch in den polaren Gebieten (Overpeck et al. 1997, Johnnesen et al. 2004, Steinacher et al. 2009), sollte zukünftig die Temperaturtoleranz adulter *Hyas araneus* der Svalbardpopulation unter Hyperkapnie untersucht werden. Die Untersuchung an *H. araneus* von Helgoland zeigte unter anderem, dass die Temperaturtoleranz mit der spezifischen Habitattemperatur korreliert. Dies entspricht den Ergebnissen aus Studien an Furchenkrebsen (*Munida*-Arten) oder dem amerikanischen Hummer (*Homarus americanus*) (Zainal et al. 1992, Worden et al. 2006). Es kann also vermutet werden, dass die *H. araneus* Population von Svalbard entsprechend ihrer Habitattemperatur auch

einen engeren Temperaturtoleranzbereich aufweist, genauso wie es auch bei anderen polaren Invertebraten zu finden ist (Peck & Convey 2000, Peck et al. 2004, Pörtner & Farrell 2008, Morley et al. 2009a).

Bei 2 °C liegt die Herzrate von *Hyas araneus* von Svalbard bei 49 ± 14 Schläge/min (Camus et al. 2002) und damit höher als jene der Helgoland *H. araneus* bei 2 °C, welche in dieser Untersuchung 40 ± 6 Schläge/min betrug (Publikation I). Eine Studie von Frederich et al. (2000) zeigte bei 2 °C sogar weitaus niedrigere Herzraten von 25 Schlägen/min bei *H. araneus* von Helgoland. Da die Herzrate mit dem Sauerstoffverbrauch korreliert (Taylor 1976, 1982, Zainal et al. 1992, De Wachter & McMahon 1996, Eshky et al. 1996, Stillman & Somero 1996), wäre zu erwarten, dass die Svalbardtiere einen höheren Sauerstoffverbrauch als die Helgolandkrebse haben. Der Sauerstoffverbrauch von *H. araneus* beider Populationen ist jedoch annähernd gleich (Camus et al. 2002, Frederich et al. 2000). Die Svalbardtiere steigern demnach ihre Herzrate, um die gleiche Menge an Sauerstoff aufzunehmen und zu den Zielorganen zu bringen. Daraus lässt sich ein weniger effektiv arbeitendes Herz der Svalbardkrebse erkennen. Die Sauerstoffverbrauchsdaten der *H. araneus* von Svalbard bei 2 °C können mit Helgolandtieren bei 9 °C verglichen werden, da diese Temperaturen sich innerhalb der Habitattemperatur und Optimaltemperatur der jeweiligen Population befindet. Die in diesen Studien gemessenen Herzraten bei 2 °C und 9 °C ergaben annähernd gleiche Raten für beide Populationen (Svalbard (2 °C) 49 ± 14 Schläge/min (Camus et al. 2002); Helgoland (9 °C) 45 - 50 Schläge/min (Frederich et al. 2000)). Dagegen ist der Sauerstoffverbrauch bei den Helgolandkrebsen bei 9 °C vierfach höher als jene der Svalbardkrebse bei 2 °C (Camus et al. 2002, Frederich et al. 2000). Es stellt sich daher die Frage, warum die Herzrate der Svalbardtiere so hoch ist, obwohl weniger Sauerstoff verbraucht wird. Eine Möglichkeit wäre, dass sich die Krebse während des Experiments aufgrund der Länge der Inkubation von 15 Tagen mit 2 °C (Camus et al. 2002) in einer Stresssituation befanden. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich die Tiere bereits unterhalb ihrer unteren kritischen Temperatur befänden, was wiederum den geringen Sauerstoffverbrauch begründet. Die Krebse mögen dann eine Kältekompensation zeigen indem sie die Herzrate erhöhen, um den Sauerstoffbedarf in den Organen weiter decken zu können.

Da das Niveau der Herzrate bei *H. araneus* der Svalbardpopulation bei 2 °C bereits sehr hoch ist, würde eine zusätzliche Erwärmung zu einem weiteren Anstieg der Herzrate führen und auch einen stärkeren Sauerstoffbedarf hervorrufen.

Untersuchungen an der Krabbe *Callinectes sapidus* zeigten nach einer Temperaturzunahme einen höheren Sauerstoffverbrauch bei kalt-akklimierten im Gegensatz zu den warm-akklimierten Individuen (Laird & Haefner 1976). Die synergistischen Effekte einer Erwärmung und einer Ozeanversauerung ließen bereits bei *H. araneus* von Helgoland eine Einengung des physiologischen Toleranzfensters erkennen. Daher kann angenommen werden, dass die Herzrate der Svalbard *Hyas araneus* im Vergleich zu jener der Helgolandkrabbe bei einer niedrigeren Temperatur sinkt. Die obere kritische Temperatur wird bei niedrigeren Temperaturen erreicht, da die energetischen Kosten der hohen Herzrate bei wärmeren Temperaturen vermutlich nicht lange gedeckt werden können. Zudem kommt die Vermutung auf, dass noch weitere Prozesse für den Verlauf der Herzrate bei erhöhten CO₂-Konzentrationen verantwortlich sind. Das CO₂ könnte sich stimulierend auf die Herzrate auswirken. Am Modellorganismus *Sipunculus nudus* wurde festgestellt, dass bei einer zunehmenden CO₂-Konzentration der Adenosin Gehalt in den Würmern zunahm, wodurch jedoch ihre Ventilationsrate gedrosselt wurde (Reipschläger et al. 1997). Bei Crustaceen wie *Homarus americanus* hingegen hat Adenosin eine stimulierende Wirkung auf die Herzrate, den Hämolympfluss und die Ventilationsrate (Maurer et al. 2008, Stegen & Grieshaber 2001). Der Anstieg der Herzrate ab 12 °C von *H. araneus* von Helgoland, welche unter erhöhten CO₂-Konzentrationen inkubiert wurden, könnte somit auch durch eine Adenosinzunahme im Tier verursacht werden. In anderen Studien an Crustaceen wurde allerdings gezeigt, dass Adenosin hemmend, z.B. auf die Übertragung von elektrischen und chemischen Reizen in Gehirninterneuronen, wirken kann (Derby et al. 1987). Außerdem führt Hyperkapnie zu einer Verlangsamung des Herzschlages (Bradykardie) (Brevard et al. 2003). Diese Befunde würden den Abfall der Herzrate bei der oberen kritischen Temperatur, initiiert durch die CO₂-/Adenosinakkumulation im Krebs, erklären. Diesen Vermutungen sollte in zukünftigen Untersuchungen nachgegangen werden.

Die synergistischen Effekte mehrerer Stressoren wie einer Erwärmung und einer Azidose durch höhere CO₂-Konzentrationen haben Auswirkungen auf das akute Temperaturtoleranzfenster von marinen Tieren (Pörtner 2010). Aufgrund dieser Erkenntnisse und jenen die an *H. araneus* von Helgoland in dieser Arbeit und auch in anderen Studien (*Cancer pagurus*: Metzger et al. 2007) gewonnen wurden, wird eine erhöhte CO₂-Konzentration mit einer zusätzlichen Erwärmung wahrscheinlich auch das Toleranzfenster von *H. araneus* von Svalbard einengen. Studien an Sub-Arktischen

Seepocken (*Semibalanus balanoides*) aus Svalbard konnten bereits zeigen, dass arktische Krebse durch erhöhte CO₂-Konzentrationen in ihrer Temperaturtoleranz, gezeigt durch reduzierte Überlebensraten, eingeschränkt sind (Findlay et al. 2010). Die genaue Wirkung der erhöhten CO₂-Konzentrationen und Erwärmung auf die Temperaturtoleranz der Sub-Arktischen *H. araneus*-Population sollte in zukünftigen Untersuchungen nachgegangen werden.

4.1.1.1 Zukünftige Untersuchungen zur Temperaturtoleranz von *Hyas araneus*

Zur Vervollständigung der Untersuchungen zur Temperaturtoleranz von *H. araneus* und Ermittlung von Populationsunterschieden bei erhöhten CO₂ -Konzentrationen sollten folgende Studien unternommen werden:

- Bestimmung der tatsächlichen kritischen Temperatur von Helgoländer *H. araneus* unter Normokapnie, da diese bei einer Temperaturerhöhung bis 25 °C noch nicht ermittelt werden konnte
- Bestimmung des Temperaturtoleranzfensters der Svalbard *H. araneus* unter Normokapnie, um nachfolgend die Auswirkungen des Klimawandels auf diese Population ermitteln zu können
- Untersuchungen der Wirkung von CO₂ und der Rolle des Adenosins im Verlauf der Herzrate bei der Bestimmung des akuten Temperaturtoleranzfensters

4.1.2 Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität und -Expression

Zur Untersuchung der Temperaturtoleranz von *Hyas araneus* der verschiedenen Populationen wurden die Enzymaktivität und -expression der Na⁺/K⁺-ATPase in den Kiemenbögen der Krebse bei 5 und 10 °C, welche den jeweiligen Hälterungstemperaturen der Svalbard und Helgolandpopulation entsprachen, gemessen (Publikation IV). Die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase ist maßgeblich von der Temperatur abhängig (Neufeld et al. 1980, Castilho et al. 2001). Bei 5 °C zeigen die Svalbardkrebse etwa die gleiche Enzymaktivität wie die Helgolandkrebse bei 10 °C. Bei einer Erwärmung des Kiemenextrakts der Svalbardkrebse auf 10 °C vervierfachte sich die

Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase im Vergleich zu 5 °C. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die Umsatzrate des Enzyms der Svalbardtiere in höherem Maße temperaturabhängig ist. Diese hohe Kapazität des Enzyms ist vermutlich auf Dauer nicht aufrecht zu halten, weil dadurch große Mengen an ATP verbraucht werden. Es ist wahrscheinlicher, dass die Enzymaktivität bei langer Wärmeexposition oder bei steigender Temperatur reduziert wird, wie es bei Krabben der Gattung *Petrolisthes* beobachtet wurde (Stillman 2002). Die Untersuchungen an den *Petrolisthes*-Arten verdeutlichten, dass die Temperatur, bei der die Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität sank, auch der kritischen Temperatur der jeweiligen Art entsprach (Stillman & Somero 1996, Stillman 2002). Demnach würde die hohe thermische Sensibilität der *H. araneus* von Svalbard im Vergleich zu den Krebsen der Helgolandpopulation auch mit einem engeren Temperaturtoleranzfenster korrelieren.

Wie würde sich nun eine erhöhte CO_2 -Konzentration auf die Na^+/K^+ -ATPase auswirken? Bei einer Azidose im extra- und intrazellulären Raum muss vermehrt Ionenregulation betrieben werden, um die Störungen im Säure-Basen-Gleichgewicht zu kompensieren. CO_2 gelangt in den extra- und intrazellulären Raum und wird durch die Carboanhydrase zu Protonen und Bikarbonat-Ionen hydriert. Durch den Na^+/H^+ -Austauscher können die entstandenen Protonen dann aus den Zellen ins umgebende Wasser transportiert werden. Dieser Austauscher wird durch einen Ionengradienten über der Membran, der durch das Schlüsselenzym Na^+/K^+ -ATPase bereitgestellt wird, angetrieben (Mantel 1985, Henry & Wheatly 1992, Pörtner et al. 2004, Melzner et al. 2009b). Die bei der Hydrolyse des CO_2 entstandenen Bikarbonat-Ionen werden über den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher aus den Zellen in den extrazellulären Raum transportiert. Dort können die Bikarbonat-Ionen Protonen binden und gegen die extrazelluläre Azidose wirken (Pörtner et al. 2004, Melzner et al. 2009b). Fische, welche über Wochen hyperkapnischen Bedingungen (10 000 ppm, 6000 ppm CO_2) ausgesetzt wurden, wiesen eine Erhöhung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität auf, welche zudem mit einer Zunahme der mRNA- und Proteinkonzentration des Enzyms korrelierte (Deigweiher et al. 2008, Melzner et al. 2009a). Diese gesteigerte Enzymaktivität ermöglicht es den Organismen, ihr Säure-Basen-Gleichgewicht stabil zu halten. Die Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität der Svalbardkrebse war bei 10°C stark gesteigert. Diese hohe Enzymaktivität würde sich bei einer Azidose zunächst positiv auf die Erhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichtes auswirken. Dies ist allerdings ein energieaufwändiger Prozess, der zu Lasten anderer Prozesse betrieben wird. Auf Dauer würde die

Enzymaktivität der Svalbardkrebse daher bei dieser Temperatur vermutlich wieder sinken.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Temperaturtoleranz adulter *Hyas araneus* (Publikation I und IV) lassen darauf schließen, dass sich die Krebse beider Populationen (Helgoland und Svalbard) in ihrer Temperaturtoleranzgrenze gegenüber einer Erwärmung und vermutlich auch gegenüber erhöhten CO₂-Konzentrationen unterscheiden. In Publikation I konnte gezeigt werden, dass die *H. araneus* der Helgolandpopulation durch erhöhte CO₂-Konzentrationen in ihrer Temperaturtoleranz eingeschränkt wurden. Der Vergleich mit einer Studie über *H. araneus* von Svalbard von Camus et al. (2002) verdeutlichte, dass die Grenze der Temperaturtoleranz bei diesen Krebsen bereits früher als bei den Helgolandkrebsen erreicht wird. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Enzymaktivität aus Publikation IV bestärkt. Demnach war die Enzymaktivität bei einer Messtemperatur von 10 °C, welche sich außerhalb der Habitatterperatur der Svalbardkrebse befindet, um ein Vielfaches gesteigert. Eine solche Steigerung der Enzymkapazität kann aber vermutlich aus energetischen Gründen nicht lange aufrechterhalten werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Temperaturtoleranzfenster der Svalbardkrebse geringer ist als jenes der Helgolandkrebse. Eine Azidose würde das Temperaturtoleranzfenster der adulten *Hyas araneus* von Svalbard dann vermutlich weiter einengen.

4.1.2.1 Zukünftige Untersuchungen zur Na⁺/K⁺-ATPase

Die Untersuchungen zu populationspezifischen Unterschieden in der enzymatischen Ausstattung wurden in dieser Arbeit an der Kieme vorgenommen und können noch weiter ausgedehnt werden:

- Inkubation adulter Tiere unter verschiedenen Temperaturen in Lang- als auch Kurzzeitexperimenten, um die populationspezifischen Akklimatisationsmuster des Enzyms zu dokumentieren
- Untersuchungen zur Auswirkung der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität auf den Säure-Basen-Haushalt und die Ionenregulation unter erhöhten CO₂-Konzentrationen
- Untersuchungen der Akklimatisationsmuster bei synergistischen Temperatur- und CO₂-Änderungen während der Larvalentwicklung von *H. araneus*

4.2 Temperaturtoleranz larvaler *Hyas araneus* im Klimawandel

Larvale *Hyas araneus* von Helgoland (54°N) und Svalbard (79°N) wurden für die vergleichenden Untersuchungen von Entwicklungszeit, Wachstum, biochemischer Zusammensetzung (Publikation II) und Kalzifizierung (Publikation III) herangezogen. Ausgehend von geographisch unterschiedlichen Habitatterperaturen (Helgoland: 3 – 18 °C; Svalbard: 0 – 6 °C) sollten mögliche unterschiedliche Anpassungsstrategien aufgezeigt und potenzielle Effekte der fortschreitenden Ozeanversauerung erörtert werden. Dazu wurden die Larven-Stadien Zoea I, Zoea II und Megalopa bei den Temperaturen 3, 9 und 15 °C und den CO₂-Konzentrationen Normokapnie (= 380 ppm), 710 ppm und 3000 ppm untersucht.

4.2.1 Entwicklung und Fitness der Larven

4.2.1.1 Entwicklung der Zoea-Stadien

Die Entwicklung der ersten Larvenstadien (Zoea I und II) zeigte bei beiden Populationen eine Verkürzung der Entwicklungsdauer mit zunehmender Temperatur. Solch eine temperaturabhängige Entwicklung konnte bereits bei vielen Crustaceenarten dokumentiert werden (z.B. *Paralithodes brevipes*: Nakanishi 1981; *Macrocheira kaempferi*: Okamoto 1993; *Lithodes antarcticus*: Vinuesa et al. 1985; *Paralomis granulosa*: Anger et al. 2003). Die Entwicklungszeit der Zoea I-Larven von Svalbard war bei 3 °C (61.4 Tage) und 9 °C (20 Tage) länger als die von Helgoland (3 °C: 46.9 Tage, 9 °C: 16.8 Tage). Diese Entwicklungsverzögerung der Larven von Svalbard könnte als ein Effekt der zunehmenden Stenothermie dieser Population gedeutet werden. Bei einer Stenothermie, wie es bei Antarktistieren beobachtet wurde, ist die Stoffwechselrate als auch die Kapazität für die Sauerstoffbereitstellung reduziert (Peck & Convey 2000, Pörtner 2006). In solch einem Falle würde sich daraus die Verlangsamung der Entwicklung der Svalbardlarven im Zoea I-Stadium erklären. Dagegen brauchten die Zoea II-Larven der Svalbardpopulation bei 3 °C signifikant weniger Zeit (59.2 Tage) bis zur nächsten Häutung als die Helgoland Zoea II-Larven (72.5 Tage). Dabei ist auffällig, dass die Zoea II-Larven der Svalbardpopulation die

gleiche Entwicklungszeit aufwiesen wie die Zoea I-Larven dieser Population. Auch bei *Lithodes santolla*, einer Sub-Antarktischen Seespinnne, war die Entwicklungszeit in zwei Zoea-Stadien (Zoea II und III) bei 3 °C gleich lang (Anger et al. 2004). Dennoch wäre zu erwarten gewesen, dass sich die Entwicklungszeit der Larven mit zunehmendem Stadium verlängert, wie es bei vielen Crustaceenarten der Fall ist (*Macrocheira kaempferi*: Okamoto 1993; *Lithodes antarcticus*: Vinuesa et al. 1985; *Chasmagnathus granulata*: Ismael et al. 1997) und ebenfalls bei *Hyas araneus* von Helgoland bereits beobachtet wurde (Kunisch & Anger 1984). Die schnellere Entwicklung der Svalbard-Zoea II bei 3 °C ist ein klares Indiz für die Präferenz der Zoea II für diese Temperatur. Diese Verkürzung der Entwicklungszeit der Zoea II-Larven und die Verlängerung der Entwicklungszeit der Zoea I-Larven bei 9 °C kann als ein Trend zu einer permanenten Kälteanpassung, vermutlich sogar als zunehmende Stenothermie der arktischen Population, gesehen werden.

Die Inkubation der Zoea-Larven unter erhöhten CO₂-Konzentrationen führte zu unterschiedlichen Reaktionen bei den Helgoland- und den Svalbard-Zoeen. Bei 3 °C verlängerte die Inkubation unter 3000 ppm CO₂ die Entwicklungszeit der Zoea I-Larven beider Populationen. Jedoch wurde bei Zoea II-Larven nur im Falle der Svalbardpopulation die Entwicklungszeit von 59.2 Tagen unter normokapnischen Bedingungen auf 69 Tage bei 3000 ppm CO₂ verlängert. Die Inkubation mit 710 ppm CO₂ hatte keinen signifikanten Effekt auf die Entwicklungszeiten der Zoeen.

Zoea-Larven leben im Pelagial und bewegen sich mit ihren Thorakopoden in geringem Maße fort (Anger 2001). Durch Strömungen können sie zudem in küstennahe Gewässer transportiert werden, wo sie neben niedrigeren Salinitäten auch Schwankungen des pH-Wertes erfahren (Wootton et al. 2008). Eine Studie von Anger (1985) an *Hyas araneus* Larven verdeutlicht die höhere Toleranz der Zoea-Larven gegenüber verschiedenen Salinitäten im Vergleich zu Larven im Megalopa-Stadium. Vermutlich tolerieren die Zoea-Stadien von *Hyas araneus* leichte pH-Änderungen wie pH 7.8 (710 ppm CO₂), da die Entwicklung der Larven bei dieser pH-Änderung unverändert zur Kontrollbedingung blieb.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass durch einen erhöhten CO₂-Gehalt von 3000 ppm die Zoea-Entwicklung beider Populationen bei kalten Temperaturen, welche sie auch im Habitat erleben, beeinträchtigt wurde (Abb. 4.2.1.).

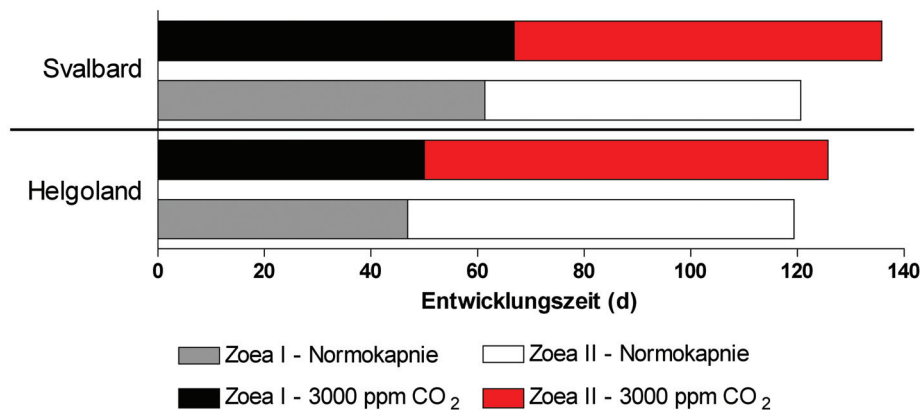


Abb. 4.2.1. Kumulative Entwicklungszeiten der Zoea-Stadien (Zoea I, II) von *Hyas araneus* der Helgoland- und Svalbardpopulation, inkubiert bei 3 °C unter Normokapnie (Zoea I: grau; Zoea II: weiß) und 3000 ppm CO₂ (Zoea I: schwarz; Zoea II: rot).

4.2.1.2 Entwicklung des Megalopa-Stadiums

Die Entwicklung der Megalopen beider Populationen ist ebenfalls temperaturabhängig. Dies wird durch ihre schnellere Entwicklung und Metamorphose zum ersten juvenilen Stadium bei 15 °C (Helgoland: 26.8 Tage, Svalbard: 40 Tage) zu der vergleichsweise langsameren Entwicklung bei 9 °C (Helgoland: 41 Tage, Svalbard: 53 Tage) ersichtlich. Zwischen den Populationen ist die Entwicklung der Megalopen bei beiden Temperaturen sehr unterschiedlich: Svalbardmegalopen benötigten für die Entwicklung um ein Vielfaches länger als die Helgolandmegalopen. Zudem war die Mortalität der Svalbardtiere sehr hoch, und nur wenige Individuen häuteten sich in das erste Juvenil-Stadium (Krebs I) (9 °C, Normokapnie: 3 von 252 Individuen, 710 ppm CO₂: 3 von 172, 3000 ppm CO₂: keine von 120; 15 °C, Normokapnie: 1 von 145 Individuen, 710 ppm CO₂: 2 von 224 Individuen, 3000 ppm CO₂: 2 von 140). Die Verzögerung der Entwicklung der Svalbardmegalopen deutet auf eine zunehmende Stenothermie (Pörtner 2006) der Larven dieser Population hin, so wie es bereits bei den Zoea-Larven vermutet wurde. Die Svalbardmegalopen würden demnach bei einer Erwärmung ihres Habitats auf 9 °C starke Probleme in ihrer Entwicklung zum nächsten Stadium haben, deutlich an der geringen Anzahl gehäuteter Juveniler. Unter der Annahme, dass sie sich nicht an eine Erwärmung mit der Zeit anpassen könnten, wird deutlich, dass die Population bei einer für sie starken Erwärmung kaum eine Chance zum weiteren Fortbestehen hätte. Da bis Ende des Jahrhunderts globale Temperaturerhöhungen bis 2.5 °C erwartet

werden können (IPCC 2001), sollte in weiteren Untersuchungen die Schwelle ermittelt werden, ab welcher Temperatur die Entwicklung der Svalbardmegalopen gestört wird.

Es kann angenommen werden, dass bei Svalbardmegalopen enzymatische oder hormonelle Systeme, die den Häutungszyklus regulieren, durch erhöhte Temperaturen (9 und 15 °C) gestört wurden (Spindler & Anger 1986, Anger & Spindler 1987, Warner & Matheson 1998, Johnson 2003, Li & Hong 2007). Dies hatte zur Folge, dass sich nur eine sehr geringe Anzahl von Individuen in das nächste Stadium (Krebs I) häuten konnte. Die Metamorphose von der Megalopa in das Krebs I-Stadium kann von häutungshemmenden Hormonen (molt-inhibiting hormones, MIH; Chang et al. 1990, Webster & Keller 1986) verlangsamt werden. Zudem ist dieser Prozess sehr energiezehrend (Dawirs 1981, Anger & Dawirs 1982) und mit einem starken Umbau der Larve während der Premolt-Phase verbunden (Anger 1983): Enzyme und Hormone, wie Proteasen oder Ecdysteroide, welche für den Häutungsprozess wichtig sind, werden synthetisiert (Passano 1961, Spindler & Anger 1986, Anger & Spindler 1987, Warner & Matheson 1998, Johnson 2003, Li & Hong 2007). Es werden Strukturproteine gebildet, die den Körper neu formen (Anger et al. 1989), und letztendlich wird die alte Kutikula von der Membran gelöst (Roer & Dillaman 1984). Bei einer gestörten Entwicklung durch erhöhte Temperaturen ist vermutlich nicht genügend Energie für die Häutung vorhanden, weil diese Energie vordergründig für die Erhaltung des Grundstoffwechsels bereitgestellt werden muss. Zudem fressen die Megalopen gegen Ende ihres Häutungszykluses immer weniger und kurz vor der Häutung nichts mehr, so dass auch keine zusätzliche Energie für die Häutung zur Verfügung stehen würde (Anger & Dietrich 1984, Anger et al. 1989). Durch die erhöhte Temperatur wird der Häutungsprozess so lange aufgehalten, bis die Larve nicht mehr fähig ist, aus ihrem alten Panzer zu schlüpfen und die Metamorphose abzuschließen.

Hyperkapnie zeigte eine unterschiedliche Wirkung auf die Megalopen der jeweiligen Population: Bei den Megalopen der Helgolandpopulation verlängerte sich die Entwicklung bei 3000 ppm CO₂ (9 °C: 49.1 Tage, 15 °C: 30.1 Tage) im Vergleich zu Normokapnie (9 °C: 41 Tage, 15 °C: 26.8 Tage) oder zu gemäßigten Hyperkapnie (710 ppm CO₂, 9 °C: 42 Tage, 15 °C: 26.7 Tage). Weiterhin war die Sterblichkeit bei den Megalopen aus Helgoland, welche bei 3000 ppm CO₂ inkubiert wurden, höher. Auch die Anzahl der Individuen, die sich zu Juvenilen häuteten, war geringer (8 von 357 Individuen bei 3000 ppm CO₂ im Gegensatz zu 67 von 312 Individuen bei

Normokapnie). Bei den Svalbardmegalopen hingegen hatte eine erhöhte CO₂-Konzentration keinen Einfluss auf die Entwicklungszeit bei 9 und 15 °C.

Die populationsspezifischen Unterschiede der Megalopen manifestieren sich durch ihre jeweiligen unterschiedlichen temperaturabhängigen Entwicklungszeiten und Reaktionen auf erhöhte CO₂-Konzentrationen. Dabei wirkten sich besonders die gesteigerte Temperatur (9 und 15 °C) auf die Svalbardmegalopen und die erhöhte CO₂-Konzentration von 3000 ppm auf die Helgolandmegalopen aus, indem es zu verzögerten Entwicklungszeiten und höheren Mortalitäten bei den Larven kam. Das hatte negative Folgen auf die Metamorphose zum juvenilen Stadium. Im Vergleich zu den Zoea-Stadien (Kapitel 4.2.1.1) waren bei den Megalopen weitaus weniger Individuen fähig, sich unter den jeweils widrigen Bedingungen (Erwärmung bei Svalbardlarven, CO₂-Erhöhung bei Helgolandlarven) zu häuten. Daraus lässt sich schließen, dass das Megalopa-Stadium das „bottleneck“ der Entwicklung von *Hyas araneus* ist, denn wenn die Larvalentwicklung nur bis zum Megalopa-Stadium ablaufen kann, ist die Entwicklung und Rekrutierung der Art gefährdet.

4.2.1.3 Wachstum und biochemische Zusammensetzung

4.2.1.3.1 Trockengewicht und Kohlenstoffgehalt

Begleitend zur Larvalentwicklung wurde die biochemische Zusammensetzung und das Wachstum innerhalb der Entwicklungsstadien untersucht. Mit den erhobenen Daten des Trockengewichtes und Kohlenstoff- und Stickstoffanteils können Aussagen über die Fitness der Larven gemacht werden. Der Kohlenstoffgehalt und das Trockengewicht der *Hyas araneus*-Larven sind vom Alter und der Temperatur abhängig (Abb. 4.2.2., ergänzend zu Publikation II). Der Kohlenstoffgehalt bei 9 und 15 °C war bei den Helgolandmegalopen vergleichsweise höher als bei den Svalbardmegalopen der gleichen Temperaturen. Die Helgolandmegalopen zeigen demnach bei 9 und 15 °C eine höhere Fitness, wachsen besser und haben zudem eine kürzere Entwicklungszeit als die Svalbardlarven.

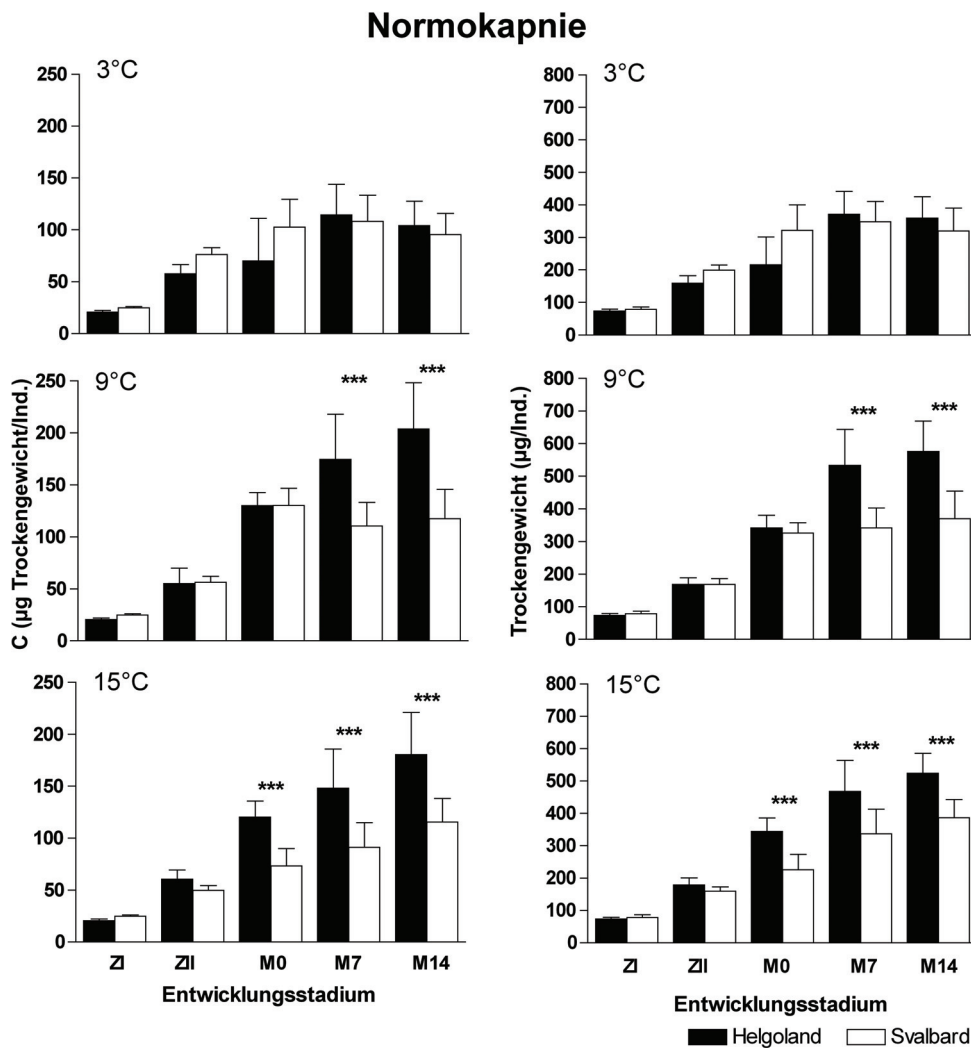


Abb. 4.2.2. Kohlenstoff (C) und Trockengewicht von Helgoland- (schwarz) und Svalbardlarven (weiß) (Zoea I (ZI), Zoea II (ZII), Megalopa 0. Tag (M0), 7. Tag (M7), 14. Tag (M14) unter normokapnischen Bedingungen bei 3, 9 und 15 °C. Sterne repräsentieren Signifikanzen zwischen Populationen im jeweiligem Entwicklungsstadium (ANOVA, $p < 0.001$).

Die Inkubation der Helgolandlarven bei erhöhten CO₂-Konzentrationen ergab eine korrelierende Abnahme des Kohlenstoffgehaltes und des Trockengewichtes mit steigender CO₂-Konzentration (Abb. 4.2.3., ergänzend zu Publikation II). Ein erhöhter CO₂-Partialdruck im Seewasser wirkt sich demnach negativ auf das Larvenwachstum aus. Dies spiegelt sich auch in den verzögerten Entwicklungszeiten der Megalopen bei 9 und 15 °C unter erhöhten CO₂-Konzentrationen wider.

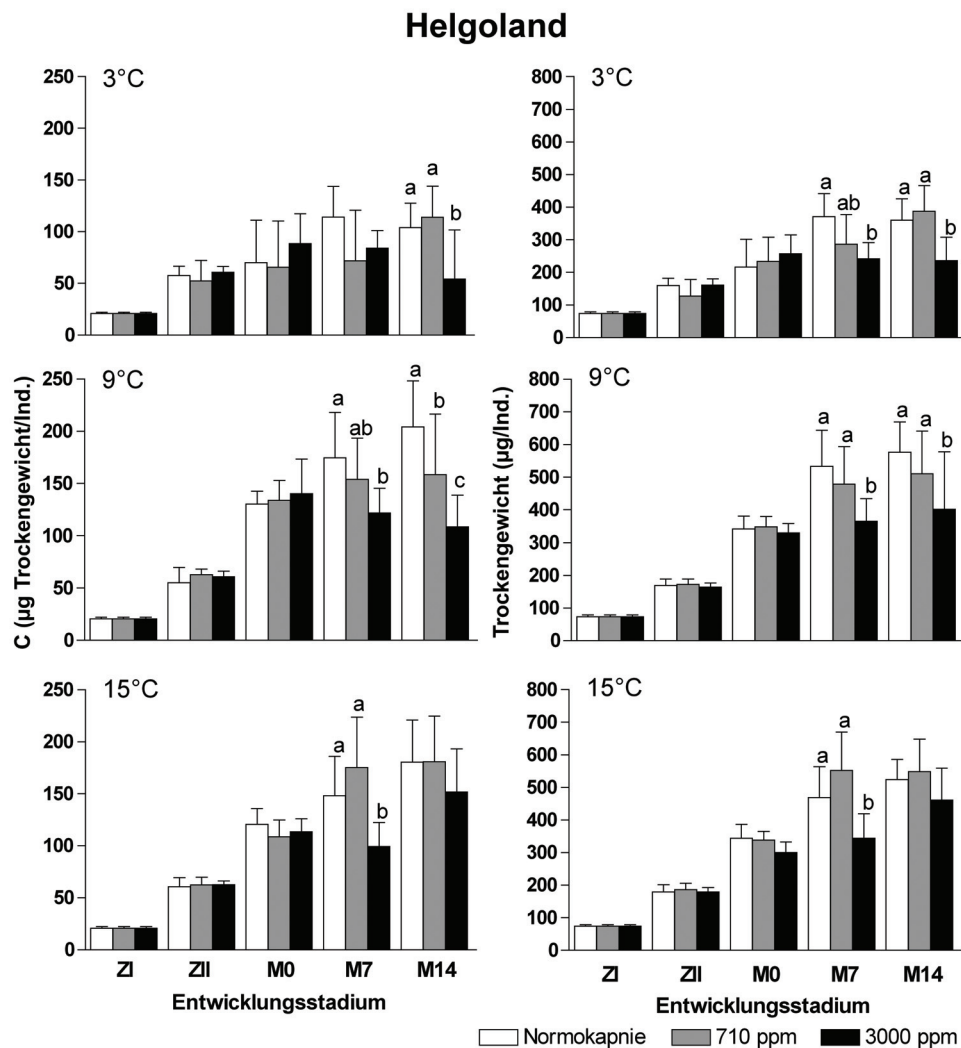


Abb. 4.2.3. Kohlenstoff (C) (linke Abb.) und Trockengewicht (rechte Abb.) von Helgolandlarven (Zoea I (ZI), Zoea II (ZII), Megalopa 0. Tag (M0), 7. Tag (M7), 14. Tag (M14)) inkubiert bei Normokapnie (weiß), 710 ppm (grau) und 3000 ppm CO₂ (schwarz) bei 3, 9 und 15 °C. Signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen CO₂-Konzentrationen im jeweiligen Entwicklungsstadium durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet (ANOVA, $p < 0.05$).

Bei den Svalbardlarven ließen die erhöhten CO₂-Konzentrationen keine Effekte auf den Kohlenstoffgehalt und das Trockengewicht erkennen (Abb. 4.2.4., ergänzend zu Publikation II). Ein Vergleich mit der Helgolandpopulation zeigt, dass die Svalbardmegalopen bereits unter normokapnischen Bedingungen ein geringeres Trockengewicht und einen geringeren Kohlenstoffgehalt bei 9 und 15 °C aufwiesen (Abb. 4.2.2.). Die Temperaturen 9 und 15 °C liegen für die Svalbardpopulation

außerhalb ihrer Habitattemperatur. Für die Svalbardlarven wurde die Entwicklung durch diese Erwärmung bereits so sehr gestört, dass der Effekt von CO₂ scheinbar keine Wirkung mehr hatte. Dies korreliert mit den Entwicklungszeiten der Svalbardmegalopen: die stark verzögerte Entwicklung lag hauptsächlich an der Erwärmung, scheinbar weniger an den erhöhten CO₂-Konzentrationen. Aufgrund dieser Erkenntnisse lässt es sich annehmen, dass die erhöhten CO₂-Konzentrationen keine Wirkung auf das Wachstum der Svalbardlarven bei Temperaturen außerhalb ihres Habitatbereiches (9 und 15 °C) hatte.

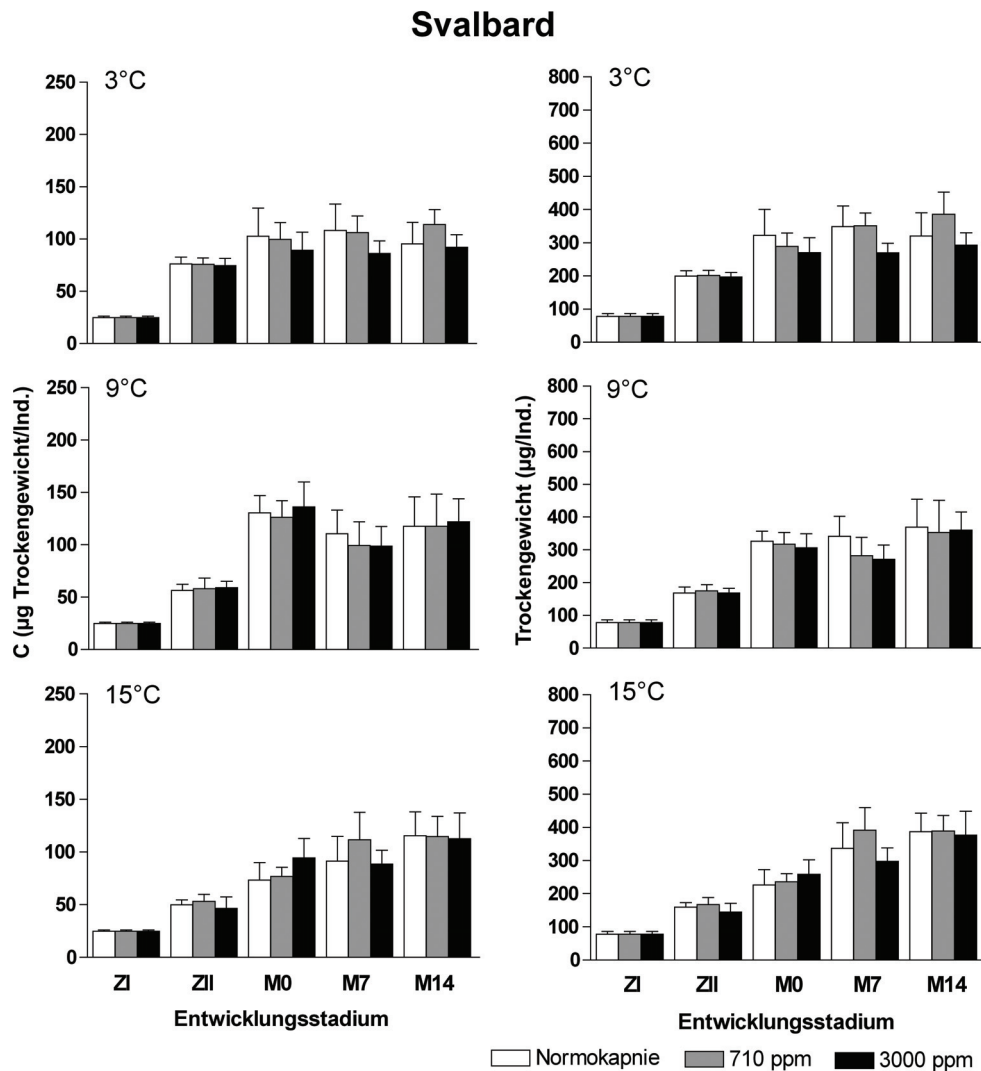


Abb. 4.2.4. Kohlenstoff (C) (linke Abb.) und Trockengewicht (rechte Abb.) von Svalbardlarven (Zoea I (ZI), Zoea II (ZII), Megalopa 0. Tag (M0), 7. Tag (M7), 14. Tag (M14)) inkubiert bei Normokapnie (weiß), 710 ppm (grau) und 3000 ppm CO₂ (schwarz) bei 3, 9 und 15 °C.

4.2.1.3.2 Trockengewicht und Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis

Im Vergleich beider Populationen wiesen die Helgolandmegalopen bei 9 und 15 °C eine stärkere Trockengewichtszunahme innerhalb der ersten 14 Tage auf (9 °C, M0: 341.6 µg/Individuum (Ind.) auf M14: 576.6 µg/Ind.; 15 °C, M0: 344.6 µg/Ind. auf M14: 524.5 µg/Ind.) als die Megalopen der Svalbardpopulation (9 °C, M0: 326.4 auf M14: 369.8 µg/Ind.; 15 °C, M0: 226.0 auf M14: 386.8 µg/Ind.). Die Helgolandmegalopen wuchsen folglich bei 9 und 15°C schneller. Außerdem war bei 9 °C das Kohlenstoff-zu-Stickstoff (C/N)-Verhältnis der Helgolandmegalopen höher (M14: 5.4) als das der Svalbardpopulation (M14: 4.6), was auf eine höhere Lipidkonzentration und höhere Fitness der Helgolandmegalopen hindeutet.

Das niedrigere C/N-Verhältnis der Svalbardmegalopen signalisiert eine geringere Menge an Lipiden, welche in der Premolt-Phase des Megalopa-Stadiums genutzt werden könnten. Während dieser Phase wird kaum oder gar keine Nahrung mehr aufgenommen und die Energie hauptsächlich aus den Lipidreserven genutzt (Anger & Dietrich 1984, Anger & Spindler 1987, Anger et al. 1989). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Svalbardmegalopen weniger aktiv waren und oftmals einen "aufgeblasenen" Carapax hatten. Die Entwicklung des Larvenkörpers zum neuen Stadium ist zu diesem Zeitpunkt vermutlich schon abgeschlossen, eine erfolgreiche Häutung dabei jedoch nicht möglich, so dass die Larven letztendlich sterben. Der Grund liegt wahrscheinlich in unzureichenden Lipidreserven, um die Energie für den Häutungsprozess aufbringen zu können. Da das C/N-Verhältnis der Svalbardlarven schon seit Beginn des Megalopa-Stadiums gering war, verschiebt sich die Häutung vermutlich nach hinten, ähnlich wie bei *H. araneus* Larven in den Hungerversuchen von Anger (1984a). In diesen Versuchen war die Bildung des Häutungshormons 20-OH-Ecdyson unter Hunger verlangsamt, und es kam zu einer verzögerten Häutung (Spindler & Anger 1986, Anger & Spindler 1987).

Betrachtet man das C/N-Verhältnis der Svalbardlarven bei 3 °C, so ist auffällig, dass die Megalopen ein geringeres Verhältnis aufwiesen als die Zoea II-Larven. Auch die Trockengewichte der Zoea II-Larven aus Svalbard waren größer als die der Helgoland-Zoea II. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass optimales Wachstum und Fitness der Larven im Zoea II-Stadium bei 3 °C liegen. Dagegen hatten die Megalopen der Svalbardpopulation bei 3 °C ein geringeres Wachstum und waren

weniger fit als die Zoea II-Larven. Bei den Helgolandlarven ist die Entwicklung wahrscheinlich genetisch durch das Schlupfmuster der Larven und der saisonal variierten Habitatterperatur geprägt (Anger & Nair 1979, Anger 1983). Die Larven von *H. araneus* von Helgoland schlüpfen nach einer zweijährigen Embryonalentwicklung (Petersen 1995) im Frühjahr, wenn sich die Habitatterperatur erhöht und die Planktonblüte bevorsteht (Anger & Nair 1979, Starr et al. 1994, Anger 2001). Demnach befinden sich die ersten Zoea-Stadien saisonal bei kälteren Temperaturen und die Megalopen dann bei wärmeren Temperaturen im Habitat (Anger & Nair 1979, Anger 1983). Auch bei den Larven der Svalbardpopulation wird es voraussichtlich diese Temperaturabhängigkeit geben. Es ist anzunehmen, dass sich die Megalopen besser bei wärmeren Temperaturen als bei 3 °C entwickeln. Dies lässt sich aus der höheren Fitness und dem höherem Trockengewicht der Megalopen bei 9 °C im Gegensatz zu jenen bei 3 °C schließen. Die Entwicklungszeit der Megalopen war jedoch bei 9 °C um ein vielfaches verlängert. Die optimale Temperatur für die Svalbardmegalopen müsste demnach zwischen 3 und 9 °C liegen. Dieser Vermutung sollte in zukünftigen Untersuchungen nachgegangen werden.

Die geringere Fitness der Svalbard *Hyas araneus* bei 3 °C, vor allem im Megalopa-Stadium, lässt vermuten, dass die Larven bei dieser Temperatur einem Kältestress ausgesetzt sind. Die Verbreitung der Art reicht im Norden nur bis Svalbard (Christiansen 1969). Kältere Gebiete können wahrscheinlich nicht besiedelt werden, weil die Megalopen schon bei 3 °C an ihre untere Temperaturtoleranzgrenze stoßen. Dies bestärkt die Vermutung, dass das Megalopa-Stadium ein „bottleneck“ in der Entwicklung der Art ist.

Die Inkubation der Larven mit erhöhten CO₂-Konzentrationen (3000 ppm) bewirkte bei den Helgolandmegalopen eine Reduzierung des Trockengewichtes und des C/N-Verhältnisses im Vergleich zur Normokapnie. Bei Megalopen, die bei 710 ppm CO₂ inkubiert wurden, reduzierte sich das C/N-Verhältnis im Vergleich zu normokapnischen Bedingungen ebenfalls. Das Trockengewicht blieb dagegen annähernd gleich. Bei Studien an Hummerlarven, *Homarus gammarus*, verringerte sich das Trockengewicht bei dem ältesten Larvenstadium bereits unter einer CO₂-Erhöhung von 1200 ppm (Arnold et al. 2009). Zukünftige Untersuchungen sollten die Schwelle der CO₂-Konzentration zwischen 710 und 3000 ppm identifizieren, bei der erstmalig CO₂-bedingte Störungen in Entwicklung, Wachstum und Fitness der *H. araneus*-Larven auftreten. Megalopen haben eine semi-benthische Lebensweise. Sie leben sowohl im

Pelagial als auch im Benthos und wählen ein geeignetes Habitat aus, um sich zum Juvenilen zu häuten und niederzulassen (Anger & Dawirs 1982, Anger 1983). Neben ihrer geringen Toleranz gegenüber erhöhten CO₂-Konzentrationen (3000 ppm) haben sie auch eine geringere Toleranz gegenüber niedrigeren Salinitäten (Anger 1985). Das bedeutet für die Megalopen, dass sie bei der Wahl eines geeigneten Habitats Küstenregionen, welche große Salinitäts- und CO₂-Konzentrationsschwankungen (Wootton et al. 2008) aufweisen, meiden müssen.

Bei den Svalbardlarven zeigten erhöhte CO₂-Konzentrationen keine Effekte auf die Fitness der Megalopen (Abb. 4.2.5., ergänzend zu Publikation II). Das C/N-Verhältnis war bei dieser Population im Vergleich zu denen von Helgoland bei 9 °C schon unter normokapnischen Bedingungen reduziert. Die Erwärmung schädigte die Fitness der Svalbardmegalopen scheinbar schon so sehr, dass der Effekt der erhöhten CO₂-Konzentrationen dann keine merkliche Wirkung mehr hatte, ähnlich wie es bereits beim Wachstum festgestellt wurde (Kapitel 4.2.1.3.1). Zur ausführlicheren Beleuchtung der Wirkung von erhöhten CO₂-Konzentrationen auf Krebslarven müssen weitere physiologische Fitnessparameter herangezogen werden. Im anschließenden Kapitel 4.2.3 (Publikation III) werden dazu die Auswirkungen der Ozeanversauerung auf die Kalzifizierung von *H. araneus*-Larven ergründet.

Svalbard

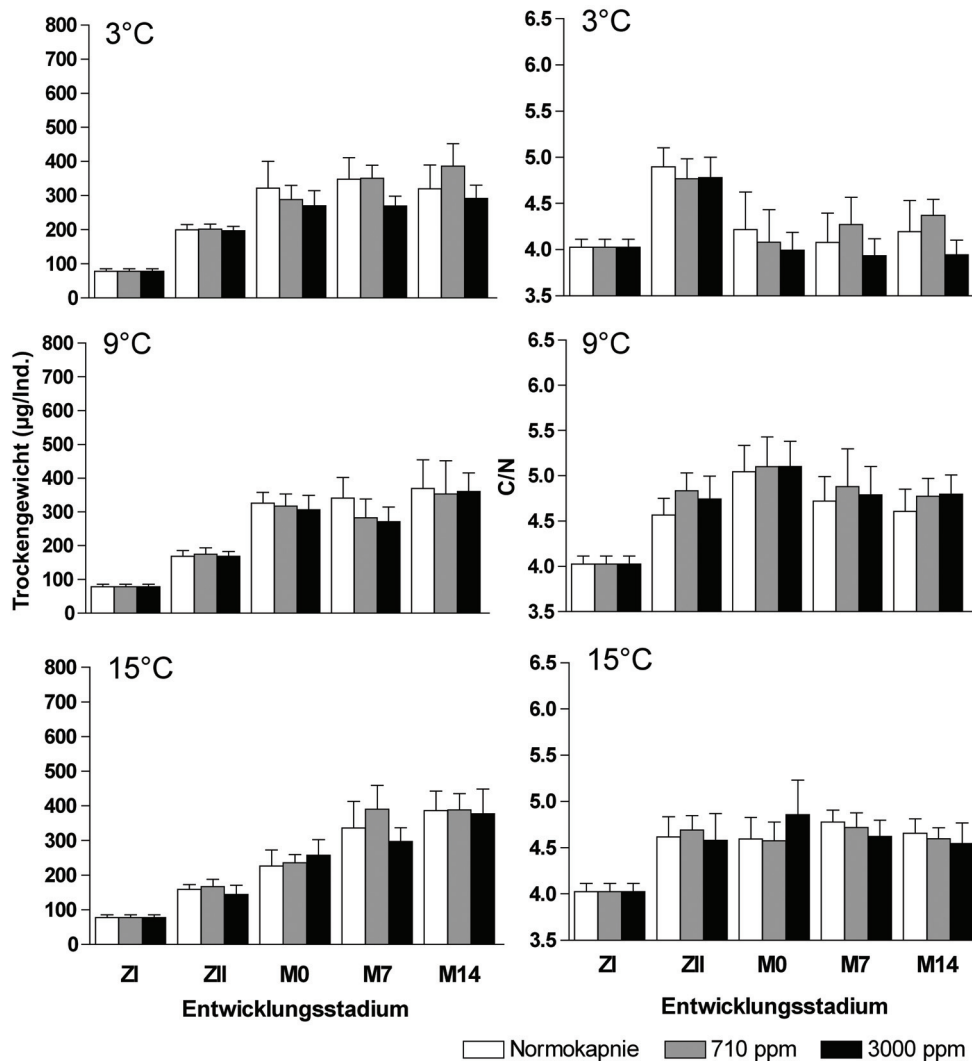


Abb. 4.2.5. Trockengewicht und C/N-Verhältnis von Svalbardlarven (Zoea I (ZI), Zoea II (ZII), Megalopa 0. Tag (M0), 7. Tag (M7), 14. Tag (M14)) inkubiert bei Normokapnie (weiß), 710 ppm (grau) und 3000 ppm CO₂ (schwarz) bei 3, 9 und 15 °C.

Bei einem genaueren Vergleich der Entwicklungsdaten mit den Trockengewicht- und C/N-Daten ist darauf zu achten, dass sich die Megalopen am 7. und 14. Tag in den jeweiligen Temperaturen unterschiedlich weit in der Entwicklung befand. Die Metamorphose der Helgolandmegalopen begann bei 15 °C ab dem 19. Tag und bei 9 °C etwa ab dem 29. Tag. Somit befand sich der Messzeitpunkt Tag 14 (M14) bei 15 °C bereits am Ende der Megalopa-Entwicklung (Premolt-Phase), bei 9 °C jedoch mitten in der Entwicklung, der Intermolt-Phase. Hinzu kommt, dass sich die Entwicklungszeit bei 3000 ppm CO₂ verlängerte. Das heißt, dass sich auch der Häutungszyklus und die damit

einhergehende Wachstumskurve verändern, wie das Modell in Abb. 4.2.6. veranschaulicht. Der Anstieg des Trockengewichtes findet bei Megalopen unter 3000 ppm CO₂ vermutlich später statt als unter normokapnischen Bedingungen, da die Metamorphose zum Beispiel bei 15 °C etwa ab dem 24. Tag begann. Wahrscheinlicher ist, dass die Megalopen unter 3000 ppm CO₂ dauerhaft auf dem niedrigen Niveau des Trockengewichtes bleiben, was auch die verringerte Anzahl der sich häutenden Individuen erklären würde. Es ist möglich, dass die Larven bei einer Azidose nicht mehr fähig sind Nahrung aufzunehmen, und deshalb nicht mehr an Gewicht zunehmen.

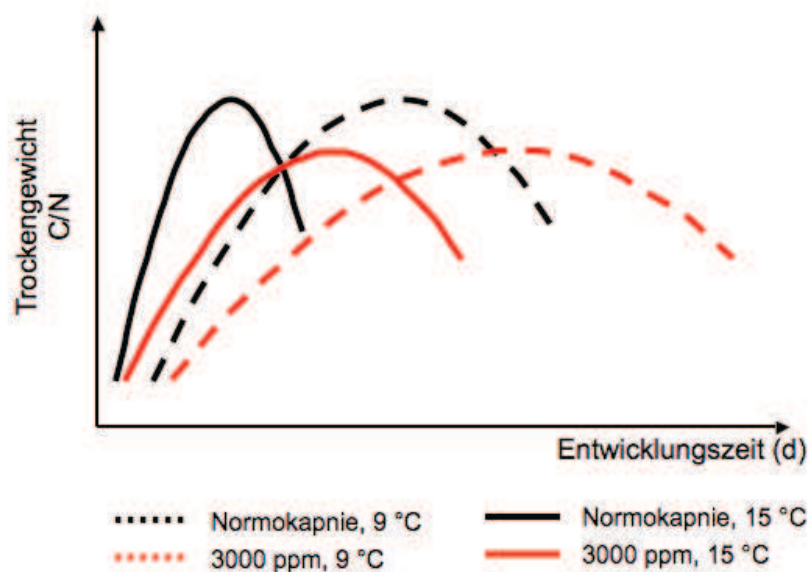


Abb. 4.2.6. Modelle zum Verlauf der Wachstumskurven von *Hyas araneus*-Megalopen in Abhängigkeit von der Temperatur und CO₂-Konzentration.

Ein Vergleich der Megalopen von Helgoland aus dem Jahr 2008 (in dieser Arbeit, Publikation II) mit denen aus den Jahren 1981/82 (Anger 1983, Anger et al. 1983) zeigt unterschiedliche Anpassungen der Larven auf. In den Jahren 1981/82 befanden sich die Megalopen von Helgoland von Mai bis Juli bei Temperaturen von etwa 9 bis 14 °C im Habitat (Anger 1983). Während der letzten 30 Jahre stieg die Wassertemperatur der Helgoländer Reede im Durchschnitt um 1.1 °C an (Wiltshire & Manly 2004). In den Sommermonaten konnte zudem auch ein Anstieg der Maximalwerte von etwa 18 °C in den 80er Jahren bis auf 20 °C im Jahr 2002 vermerkt werden. Demzufolge sind die Megalopen von Helgoland heute auch wärmeren Temperaturen ausgesetzt als den 9 bis 14 °C im Habitat. Die Daten der biochemischen Analyse zeigten, dass das C/N-Verhältnis der Megalopen von 2008 ($C/N > 5.0$, gemessen bei 9 und 15 °C; Publikation II) im Vergleich zu denen vor 25 Jahren ($C/N = 4.6$, gemessen bei 12 °C; Anger et al.

1983) größer ist. Die Larven von *H. araneus* sind also trotz der Erwärmung im Jahr 2008 fitter als 25 Jahre zuvor. Demzufolge haben sich die Larven vermutlich an die Erwärmung in der Nordsee angepasst. Unterschiede, die sich auf eine unterschiedliche Ernährung begründen würden, können ausgeschlossen werden, da in allen Experimenten mit *Artemia* sp.-Nauplien gefüttert wurde. Das Modell in Abb. 4.2.7. beschreibt die postulierten Toleranzbereiche der Megalopen von 1981/82 und 2008. Die Megalopen von 2008 haben im Vergleich zu jenen von vor 30 Jahren wahrscheinlich eine größere Toleranz gegenüber höheren Temperaturen als 14 °C, da die Larven auch bei 15 °C ein hohes C/N-Verhältnis hatten (Publikation II) (grauer Pfeil, Abb. 4.2.7.). Bei der Inkubation der Megalopen mit erhöhten CO₂-Konzentrationen reduzierte sich deren Fitness vermutlich wieder auf das Niveau von vor 25 Jahren (rote Pfeile, Abb. 4.2.7.). Die Temperaturtoleranz wird also durch eine CO₂-Erhöhung zunehmend eingeschränkt. Die gewonnene Anpassung der Megalopen an die Erwärmung würde höchstwahrscheinlich bei einer Steigerung des CO₂-Gehaltes in der Nordsee wieder verloren gehen. Demnach ist anzunehmen, dass die Larven dann wieder einen Temperaturtoleranzbereich wie die Megalopen im Jahr 1981/82 hätten.

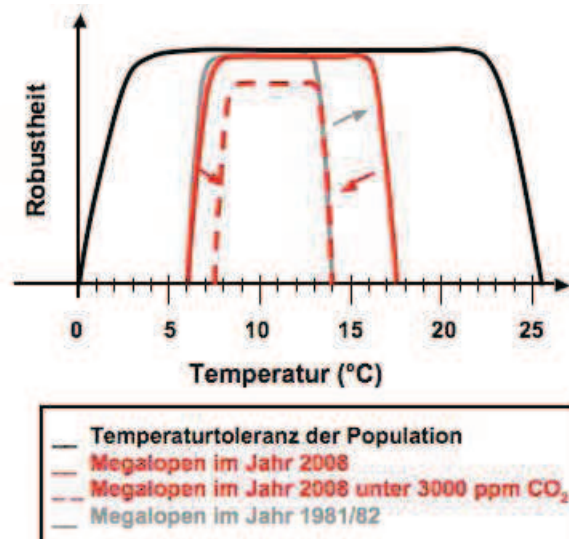


Abb. 4.2.7. Temperaturtoleranz von *Hyas araneus*-Megalopen von Helgoland im Jahr 2008 (diese Arbeit) im Vergleich zu Megalopen im Jahr 1981/82 (Anger 1983). Robustheit: Fähigkeit eines Organismus, Umweltschwankungen zu tolerieren.

Die Larven von Helgoland waren scheinbar fähig, sich in wenigen Generationen an die Erwärmung der letzten 30 Jahre anzupassen, wie die gesteigerten C/N-Werte in dieser Arbeit (Publikation II) im Vergleich zur Studie von Anger et al. (1983) belegen können. Jedoch bereiteten die erhöhten CO₂-Konzentrationen ihnen Probleme, was durch eine verzögerte Entwicklung und verringertes Wachstum und Fitness deutlich wird (Publikation II). Es stellt sich die Frage, ob die Larven fähig sind, sich beispielsweise durch Mutationen ebenso schnell an pH-Änderungen anzupassen, welche für die nächsten Jahrzehnte prognostiziert werden. Dabei spielt sicherlich auch eine Rolle, wie schnell es zu Veränderungen der Umwelt kommt. Die im IPCC berechneten Szenarien (Abb. 1.1.4, IPCC 2001) zeigen, dass die Temperatur bis 2100 zusätzlich um 2.5 °C ansteigen kann. Das wäre eine schnellere Erwärmung als jene um 1.1 °C in den letzten 40 Jahren. Zudem wurde berechnet, dass bis 2100 auch die CO₂-Konzentration auf 710 ppm ansteigen wird (IPCC 2001), was einer Verdopplung der heutigen Konzentration entspricht. Es bleibt zu untersuchen, ob sich die Krebse auch an eine schnellere Erwärmung und eine zusätzliche Erhöhung der CO₂-Konzentration anpassen könnten. Genetische Untersuchungen könnten klären, ob es zu Veränderungen oder Anpassungen durch diese veränderten Umweltparameter kommt und wie schnell diese Anpassungen an nächsten Generationen weitergegeben werden.

4.2.1.4 Zukünftige Untersuchungen zur Larvalentwicklung von *Hyas araneus*

Zur Temperaturtoleranz von *H. araneus*-Larven können weitere Untersuchungen unternommen werden:

- Untersuchung der Svalbardlarven bei unterschiedlichen Temperaturen innerhalb ihres Habitatterperaturbereiches von 0 und 6 °C, um ein präziseres Toleranzfenster der jeweiligen Entwicklungsstadien zu ermitteln
- Untersuchungen zu genetischen Unterschieden der beiden Populationen und ihrer phänotypischen Plastizität unter dem Einfluss unterschiedlicher Umgebungsfaktoren
- Um genaue Aussagen über die Fitness in einem Larvenstadium machen zu können, müssen zukünftig Proben fortlaufend, während des kompletten Entwicklungsstadiums, genommen und analysiert werden

- Untersuchung zum Fressverhalten unter CO₂-Exposition während der kompletten Larvalentwicklung
- Untersuchungen zu den Fähigkeiten der Art in der Ionenregulation und vor allem der Larven unter CO₂-Exposition zur Klärung der Frage, wofür die Energie während der Entwicklung genutzt wird
- Untersuchungen unter verschiedenen CO₂-Konzentration zwischen 710 und 3000 ppm, um die Schwelle zu manifestieren, ab welcher CO₂-Konzentration die Larvalentwicklung beeinträchtigt wird

4.2.2 Grenzen der Temperaturtoleranz von *Hyas araneus*-Larven

Hyas araneus-Larven der beiden Populationen unterscheiden sich in ihrer Temperaturtoleranz. Die Zoea II-Larven der Svalbardpopulation hatten einen Toleranzbereich von 0 bis 15 °C mit einem Maximum an Robustheit bei 3 °C. Die Robustheit stellt das Maß der Fähigkeit Umweltschwankungen zu tolerieren dar (Abb. 4.2.8.). Begründet wird diese Begrenzung der Temperaturtoleranz mit der geringen Entwicklungszeit und relativ hohen Fitness im Vergleich zu den anderen Stadien. Mit zunehmender Temperatur (9 und 15 °C) sinkt dann das Gewicht der Larven, was die weitere Reduzierung der Robustheit ab 3 °C bis zur Grenze der Temperaturtoleranz (15 °C) begründet. Die Zoea I-Larven von Svalbard haben bei 3 °C bereits eine geringere Robustheit, da ihre Entwicklungszeit jener der Zoea II-Larven dieser Population gleicht. Im Vergleich zur Entwicklungszeit der Helgoland Zoea I-Larven war diese zudem verlängert. Weiterhin zeigten die Zoea I-Larven von Svalbard eine geringere Fitness als die anderen Stadien dieser Population. Bei einer Erwärmung auf 15 °C ist ihre Toleranz durch Entwicklungsverzögerungen (bei 9 und 15 °C beobachtet, Publikation II) eingeschränkt. Die Megalopen der Svalbardpopulation haben bei 3 °C eine geringere Fitness als die Zoea II-Larven. Auch bei 9 °C kommt es zu extremen Entwicklungsverzögerungen und zu einer reduzierten Fitness im Vergleich zu den Helgolandmegalopen. Wie bereits diskutiert wurde, liegt die optimale Temperatur für die Megalopa-Entwicklung wahrscheinlich bei einer Temperatur zwischen 3 und 9 °C. Die untere Temperaturtoleranzgrenze der Megalopen kann bei 3 °C gesetzt werden, da die Larven bei dieser Temperatur im Vergleich zu höheren Temperaturen (9 und 15 °C)

und Larven im Zoea II-Stadium bei 3 °C eine niedrigere Fitness (gemessen am Trockengewicht und C/N-Verhältnis, Publikation II) zeigten. Bei einer Erwärmung auf 9 und 15 °C war die Entwicklung der Megalopen stark verzögert und deren Fitness gegenüber von Helgolandmegalopen bei den jeweiligen Temperaturen reduziert. Folglich kann vermutet werden, dass die obere Temperaturtoleranzgrenze der Svalbardmegalopen bereits bei 9 °C erreicht wird.

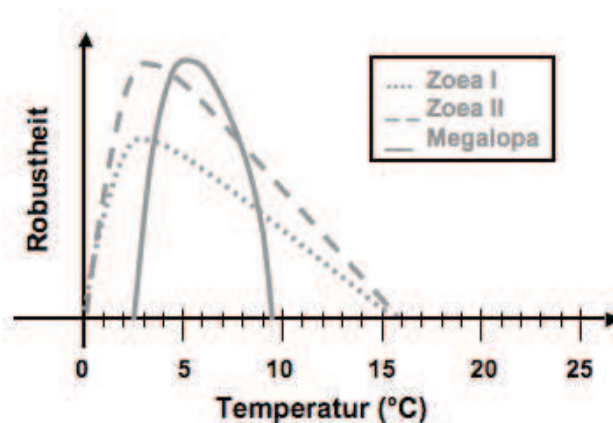


Abb. 4.2.8. Temperaturtoleranz der verschiedenen Larvenstadien von *Hyas araneus* der Svalbardpopulation. Robustheit: Fähigkeit eines Organismus Umweltschwankungen zu tolerieren.

Hyas araneus-Larven der Helgolandpopulation entwickelten sich in allen Stadien, bis auf die Zoea II bei 3 °C, schneller. Außerdem zeigten sie bei Temperaturen von 9 und 15 °C ein schnelleres Wachstum und eine höhere Fitness als die Svalbardlarven (Publikation II). Daraus lässt sich schließen, dass der Temperaturtoleranzbereich der Helgolandlarven größer als jener der Svalbardlarven ist.

Eine Art kann sich an sich ändernde Umweltparameter wie die Temperatur durch seine phänotypische Plastizität anpassen (Somero 2002). Untersuchungen an Invertebraten wie Schnecken (Gattung *Haliothis*; Dahlhoff & Somero 1993), Muscheln (*Mytilus californianus*: Williams & Somero 1996) oder Krebsen (*Cancer pagurus*, *Carcinus maenas*: Cuculescu et al. 1998) konnten bereits unterschiedliche phänotypische Plastizitäten als Anpassung an latitudinale Gradienten, Saison oder Tide aufzeigen. *Hyas araneus* könnte sich an die unterschiedlichen Habitattertemperaturen durch phänotypische Plastizität, welche durch unterschiedliche Toleranzbereiche ausgeprägt wird, anpassen. Dabei wären beide Toleranzbereiche der jeweiligen Population in einem Gesamttoleranzbereich integriert (Modell A, Abb. 4.2.9A.). Die

Art hat somit einen Genotyp mit zwei Phänotypen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Anpassung an unterschiedliche Habitatterperaturen in unterschiedliche populationspezifische Toleranzbereiche resultiert, welches wiederum eine anfängliche Selektion signalisiert (Modell B, Abb. 4.2.9B.). Anhand der in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse (Publikation II) lässt sich annehmen, dass *H. araneus* nicht nur Anpassungen durch phänotypische Plastizität aufweisen, sondern sich wahrscheinlich bereits in den Anfängen einer Selektion befindet. Die Populationen haben sich spezifisch an ihre jeweiligen Habitattertemperaturbereich angepasst, wie die Ergebnisse zu Entwicklungszeiten, Wachstum und C/N-Werte zeigen (Publikation II). Diese populationspezifische Anpassung wird auch durch Entwicklungsstörungen der Svalbardlarven außerhalb ihres Habitattertemperaturbereiches deutlich. Beide Populationen haben demnach unterschiedliche, spezifische Toleranzbereiche. Durch die räumliche Trennung der Populationen würde die Aufspaltung in zwei Arten bzw. Genotypen gefördert. Ob die unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen der beiden Populationen eventuell sogar Anzeichen für eine Selektion und somit für die Aufspaltung in zwei Arten ist, müssten populationsgenetische Untersuchungen klären.

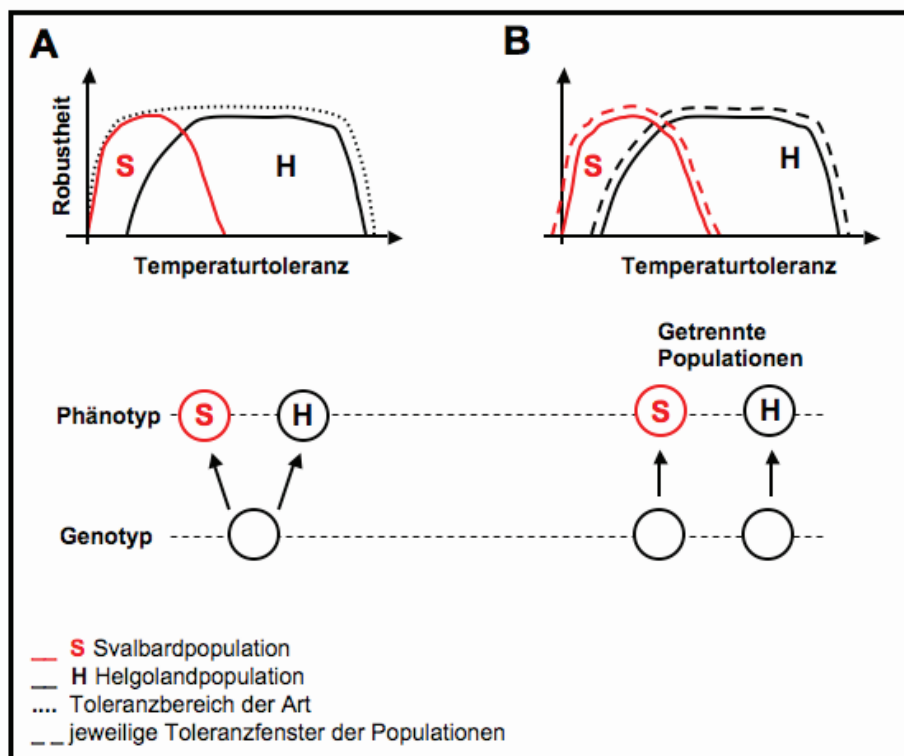


Abb. 4.2.9. Modelle zur Temperaturtoleranz der beiden *Hyas araneus*-Populationen (Helgoland (H, schwarz) und Svalbard (S, rot)). (A) phänotypische Plastizität, (B) Selektion. Robustheit: Fähigkeit eines Organismus Umweltschwankungen zu tolerieren. Erläuterung siehe Text.

4.2.3 Kalzifizierung von *Hyas araneus*-Larven

Kalzium-Ionen sind im Exoskelett an Karbonat-Ionen gebunden. Bei einer Azidose kann freiwerdendes Karbonat aus dem Exoskelett als Puffer wirken. Zur Untersuchung der Kalzifizierung von *Hyas araneus*-Larven wurde der Kalziumgehalt der Larven beider Populationen unter dem Einfluss erhöhter Temperatur und erhöhten CO₂-Gehaltes gemessen (Publikation III). Dazu wurden *H. araneus*-Larven aus Helgoland und Svalbard am 0. Tag (= frisch geschlüpft) der Zoea I (ZI), 3. Tag der Megalopa (M3), 7. Tag der Megalopa (M7) und am 14. Tag der Megalopa (M14) beprobt. Zuvor wurden die Larven bei verschiedenen Temperaturen (3, 9 und 15 °C) und CO₂-Konzentrationen (Normokapnie, 710 ppm und 3000 ppm) gehältert.

Die Kalzifizierung von *Hyas araneus*-Larven ist genauso wie deren Entwicklung abhängig von der Temperatur. Studien an der Seepocke *Chthalamus montagui* zeigten ebenfalls, dass die Kalzifizierung bei kalten Temperaturen geringer ist als bei wärmeren Temperaturen (Clavier et al. 2009). Die Kalzifizierung ist zudem abhängig von der Entwicklung. Sie beginnt bei Krebslarven mit der Häutung zur Megalopa und nimmt dann mit der Entwicklung zu (Anger 2001), wie es sich auch in der ansteigenden Kalziumkonzentration in den Megalopen vom 3. zum 14. Tag zeigte (Publikation III).

Die Larven beider Populationen zeigten einen unterschiedlichen Kalziumgehalt. Die Helgolandmegalopen hatten unter normokapnischen Bedingungen bei 3 °C (3.6 – 4.1 mg/l/mg Frischgewicht) und 9 °C (4.3 – 4.7 mg/l/mg Frischgewicht) einen signifikant höheren Kalziumgehalt als die Svalbardmegalopen (3 °C: 2.1 – 2.3 mg/l/mg Frischgewicht, 9 °C: 2.6 – 3.1 mg/l/mg Frischgewicht). In Publikation II konnte gezeigt werden, dass die Svalbardmegalopen auch ein geringeres Wachstum bei 9 °C aufwiesen. Solch eine Korrelation zwischen dem Trockengewicht und dem Kalziumgehalt wurde auch bei anderen Crustaceenarten gefunden (*Penaeus monodon*: Wickens 1984; *Homarus gammarus*: Arnold et al. 2009).

Durch eine erhöhte CO₂-Konzentration von 3000 ppm bei 3 °C verringerte sich der Kalziumgehalt der Svalbardmegalopen drastisch bei jedoch gleich bleibendem Trockengewicht. Bei den Helgolandlarven dagegen kam es bei dieser Temperatur zu einer korrelierenden Abnahme der Kalziumkonzentration mit dem Trockengewicht. Diese Populationsunterschiede könnten durch unterschiedliche Carapaxstrukturen

zustande gekommen sein. Gutowska et al. (2010) fanden heraus, dass die Chitinschicht des Schulpes von Cephalopoden (*Sepia officinalis*) unter erhöhten CO₂-Konzentrationen kompakter organisiert und der Anzahl des zur Verfügung stehenden Kalziumkarbonates angepasst ist. Das gebundene Kalziumkarbonat in der Chitinschicht des Carapax macht den Großteil des Gewichtes von Krebsen aus (Wickens 1984, Arnold et al. 2009, Findlay et al. 2009). Ist die Kalziumkonzentration der Svalbardmegalopen bei gleich bleibendem Gewicht reduziert, müssen andere Bestandteile als Kalziumkarbonat das Gewicht der Larve ausmachen. Eine Möglichkeit hierfür wäre beispielsweise die vermehrte Einlagerung von Chitin. Untersuchungen an der Krabbe *Scylla serrata* bestätigen, dass unter sauren Bedingungen der Chitinanteil im Exoskelett zunimmt (Pratoomchat et al. 2002b, Pratoomchat et al. 2003).

Bei 15 °C ist kein Unterschied mehr zwischen den Kalziumkonzentrationen der jeweiligen Populationen unter normokapnischen Bedingungen vorhanden. Allerdings haben die Svalbardmegalopen bei 15 °C ein geringeres Gewicht als die Helgolandmegalopen. Unter erhöhten CO₂-Konzentrationen steigt die Kalziumkonzentration bei den Svalbardmegalopen im Vergleich zu den Helgolandmegalopen signifikant an. Dies kann ein Effekt der kompensatorischen Kalzifizierung sein, wie es bei der Seepocke *Amphibalanus amphitrite* (McDonald et al. 2009) beobachtet werden konnte. Der vermutete Kompensierungseffekt der Kalzifizierung der Svalbardlarven (Publikation III) kann mit der bei adulten *H. araneus* der Svalbardpopulation beobachteten Kältekompensation des Enzyms Na⁺/K⁺-ATPase (Publikation IV) verglichen werden. Untersuchungen zur Enzymaktivität der Na⁺/K⁺-ATPase an adulten *Hyas araneus* (Publikation IV) konnten bei 10 °C eine vierfache Erhöhung der Enzymaktivität der Svalbardkrebse im Vergleich zur Enzymaktivität der Helgolandtiere feststellen, was ebenfalls auf eine Kompensierung und eine thermische Sensibilität des Enzyms hindeutet. Somit kann vermutet werden, dass an der Kalzifizierung beteiligte Enzyme, die mit der Na⁺/K⁺-ATPase gekoppelt sind (z.B. Na⁺/Ca²⁺-Austauscher: Neufeld & Cameron 1993), von der thermischen Sensitivität der Na⁺/K⁺-ATPase profitieren. Weiterhin stellt sich die Frage, ob auch andere Enzyme und Transporter, die an der Kalzifizierung beteiligt sind, in ihrer Effizienz möglicherweise gesteigert sind. Dadurch könnte z.B. der Transport von Kalzium durch die Ca²⁺-ATPase, Na⁺/Ca²⁺-Austauscher oder Ca²⁺/H⁺-Austauscher, oder die Verbindung der Kalzium-Ionen mit Karbonat-Ionen durch die Carboanhydrase verbessert werden. Letztendlich könnte auch die Einlagerung von CaCO₃ in die Chitinmatrix davon positiv beeinflusst

werden (Travis 1955, Giraud 1981, Henry & Cameron 1983, Cameron 1985a, b, Neufeld & Cameron 1993, Wheatly 1999). Die aufgezeigte thermische Sensitivität des Enzyms der Svalbardtiere trat bei 10 °C auf, welche ebenfalls außerhalb des Habitattemperaturbereiches lag. Wahrscheinlich kann ein so hohes Niveau an Enzymaktivität auf Dauer nicht aufrechterhalten werden, da die energetischen Kosten zu groß sind. Das kann auch für den Kompensierungseffekt der Kalzifizierung bei den Larven vermutet werden. Die Publikation II zeigte, dass die Entwicklung der Svalbardmegalopen durch eine Erwärmung auf 9 °C bereits stark verzögert war und nur wenige Individuen sich ins erste juvenile Stadium häuten konnten. Untersuchungen an Seepocken-Postlarven (Findlay et al. 2010) veranschaulichten ebenfalls eine reduzierte Kalzifizierung von Larven bei Temperaturen, die höher als jene ihrer Habitattemperaturen waren.

Helgolandmegalopen weisen unter der erhöhten CO₂-Konzentration (3000 ppm) bei allen Temperaturen sowohl eine Reduzierung in der Kalziumkonzentration als auch im Trockengewicht auf. Diese Larven haben offenbar im Gegensatz zu den Svalbardmegalopen weniger Kalziumkarbonat in den Carapax eingelagert. Dadurch könnte die Dichte der Larven verringert werden, welche maßgeblich von der Kalzifizierung abhängig ist (Amato et al. 2008). Die vermutlich veränderte Dichte-eigenschaft des Carapax unter CO₂ hätte gravierende Folgen für die semi-benthischen Megalopen. Leichtere Larven haben einen größeren Auftrieb und könnten Probleme mit dem Leben am Boden bekommen (Spaargaren 1980, Amato et al. 2008). Dies bedeutet für die Helgolandmegalopen, dass sie mehr Energie aufbringen müssten, um dem Auftrieb entgegen zu wirken. Hinzu kommt, dass durch die geringere Einlagerung von Kalziumkarbonat im Carapax dieser permeabler sein könnte. Die Larven wären dann stärker gegenüber Krankheitserregern anfällig, weil Keime leichter durch die perforierte Chitinschicht zum Körperinneren gelangen können. Die geringere Kalziumkarbonateinlagerung führt auch zu einer geringeren Aushärtung des Carapax. Der physikalische Schutz gegenüber Predatoren würde somit verloren gehen.

Mit der Häutung zur Megalopa beginnt die Kalzifizierung der Larven (Anger 2001). Der geringere Kalziumgehalt in den Megalopen unter erhöhten CO₂-Bedingungen bedeutet demnach eine Verminderung des Kalziumtransports zum Carapax (Neufeld & Cameron 1993, Wheatly 1999). Durch die Azidose im Larvenkörper wird vermutlich mehr Energie für den Erhalt des Säure-Basen-Gleichgewichtes benötigt, die dann für den Transport von Kalzium-Ionen fehlt

Außerdem wäre die Einbindung von Kalziumkarbonat ins Exoskelett mit Unterstützung durch die Carboanhydrase erschwert (Giraud 1981, Henry & Cameron 1983). Die Abnahme des pH-Wertes im Larvenkörper verursacht eine Gleichgewichtsverschiebung des Karbonat-Puffer-Systems, so dass sich mehr Bikarbonat (HCO_3^-)- als Karbonat-Ionen im Körper befinden. Infolgedessen stehen weniger Karbonat-Ionen zur Bildung von Kalziumkarbonat und dessen Einlagerung ins Exoskelett zur Verfügung. Mit zunehmender Megalopa-Entwicklung stieg der Kalziumgehalt der Larven an. Es könnte vermutet werden, dass eine gesteigerte Carboanhydrase-Aktivität den Transport und die Einlagerung von CaCO_3 ins Exoskelett verbesserte. Dieser Vermutung sollte in zukünftigen Untersuchungen nachgegangen werden.

Die Ergebnisse der Kalzifizierungsanalyse (Publikation III) verdeutlichten, dass erhöhte CO_2 -Konzentrationen negative Auswirkungen auf den Kalziumgehalt beider Populationen hatten, wobei der Effekt bei den Svalbardmegalopen stärker ausgeprägt war als bei den Megalopen der Helgolandpopulation. In der Studie zur Entwicklung und Fitness der Larven (Publikation II) wurde gezeigt, dass die Svalbardmegalopen vordergründig durch die Temperatur in ihrer Entwicklung im Vergleich zu den Helgolandmegalopen eingeschränkt sind. Dabei fiel auf, dass die Fitness der Svalbardmegalopen unter normokapnischen Bedingungen bei 3 °C geringer war als bei anderen Larvenstadien und Temperaturen. Auch diese Studie zur Kalzifizierung (Publikation III) verdeutlicht, dass die Kalzifizierung der Svalbardmegalopen bei 3 °C geringer war als bei den Helgolandmegalopen. Dies bestätigt wiederum die entwickelte Hypothese, dass die Svalbardlarven bei 3 °C bereits an ihre untere Temperaturtoleranzgrenze stoßen. Eine erhöhte CO_2 -Konzentration hatte keinen weiteren Effekt auf die Fitness der Svalbardmegalopen. Der Kalziumgehalt der Svalbardmegalopen war dagegen bei allen Temperaturen durch die Inkubation mit 3000 ppm CO_2 vermindert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Entwicklungszeitverzögerung bei 9 und 15 °C (Publikation II) nicht nur durch den negativen Effekt der Erwärmung, sondern auch durch den negativen Effekt der Azidose auf die Kalzifizierung zustande kommt.

Die Ergebnisse beider Populationen (Publikation II und III) zeigen, dass das Megalopa-Stadium am sensitivsten ist. Bei der Helgolandpopulation wirkt vor allem die erhöhte CO_2 -Konzentration, bei der Svalbardpopulation dagegen haben sowohl die Erwärmung als auch die Azidose eine einschränkende Wirkung auf die

Temperaturtoleranz der Megalopen. Zusätzlich ist die Toleranz in die Kälte bei 3 °C eingeeengt. Diese Ergebnisse bestätigen abermals die Hypothese, dass das Megalopa-Stadium ein „bottleneck“ in der Entwicklung der Art ist.

4.2.3.1 Zukünftige Untersuchungen zur Kalzifizierung

Die gewonnenen Ergebnisse zur Kalzifizierung von Larven lassen viel Raum für weitere Forschung:

- Messung der Kalzifizierung der Megalopen bis zur Häutung ins nächste Stadium, um Effekte der Versauerung im gesamten Stadium zu dokumentieren
- Untersuchung der Carapaxstruktur der Larven, beispielsweise mit der Rasterelektronenmikroskopie, um populationsspezifische Unterschiede zu analysieren
- Untersuchung der an der Kalzifizierung beteiligten und von der Versauerung betroffenen Enzyme und Transporter sowie deren Aktivität und Expression, um mögliche populationsspezifische enzymatische Anpassungen zu identifizieren

4.3 Ausblick

Für die Untersuchungen an den Larvenstadien der Seespinne *Hyas araneus* wurden eiertragende Weibchen in einem Durchflusssystem mit normokapnischen Seewasser und bei kalter Temperatur (4 – 5 °C) gehältert. Die Publikationen II und III konnten einige Effekte der Erwärmung und Ozeanversauerung auf die Larvalentwicklung aufzeigen. Es stellt sich zudem die Frage, wie sich die Toleranz der Larven während ihrer Entwicklung verhalten würde, wenn bereits die eiertragenden Weibchen erhöhten Temperaturen und CO₂-Konzentrationen ausgesetzt würden. Solche Untersuchungen zu synergistischen Effekten sind künftig von großer Bedeutung, um ein vollständiges Bild über die Toleranz der Art/Populationen und ihrer Entwicklungs- und Lebensstadien zu erhalten.

Bereits Anger et al. (1983) konnten zeigen, dass bei 18 °C inkubierte Weibchen ihre Brut abstoßen. Krabbenartige eiertragende Weibchen betreiben Brutpflege (Wheatly 1981, Fernández et al. 2000, Baeza & Fernández 2002). Durch die Bewegung des Pleons werden die Eier durch die erzeugte Strömung mit Sauerstoff versorgt (Fernández et al. 2000). Dadurch verbrauchen die Weibchen zusätzlich Energie und Sauerstoff. Um dem zusätzlichen Bedarf gerecht zu werden, steigt die Herz- und Ventilationsrate der Weibchen. Bei einer Erwärmung des Habitats könnten die physiologischen Kapazitäten der Weibchen schon in ihrem Pejus- oder sogar kritischem Bereich sein. Käme noch ein zusätzlicher Bedarf an Sauerstoff für die Pleonbewegung bei der Erwärmung hinzu, würde die kritische Temperatur wahrscheinlich früher erreicht werden. Eiertragenden Weibchen entgehen diesem Dilemma, indem sie ihre Brut abstoßen (Anger 1983) und somit ihren Sauerstoffbedarf wieder senken und die physiologische Toleranz erhöhen. Eine zusätzliche CO₂-Erhöhung könnte demzufolge die eiertragenden Weibchen noch stärker beeinträchtigen als Tiere, die keine Eier tragen. Die obere kritische Temperatur wäre bei diesen Tieren vermutlich niedriger, so dass die Weibchen ihre Brut möglicherweise schon bei Temperaturen unter 18 °C abstoßen. Das Verhalten der eiertragenden Weibchen sollte in zukünftigen Studien untersucht werden, da es wichtig für das Überleben der Population ist.

Embryonen sind für ihre Entwicklung auf eine optimale Sauerstoffzufuhr aus der Umgebung angewiesen. Eine Veränderung von Umweltfaktoren, wie z.B. der Temperatur, führt zu einer Erhöhung ihres Sauerstoffbedarfs (O'Leary Amsler & George 1984, Brante et al. 2003) und zur Reduktion ihrer Entwicklungs- und Überlebensrate (Zhao et al. 1993, García-Guerrero et al. 2003). Veränderte Umweltfaktoren während der Embryonalentwicklung wirken sich in der Folge auch auf die Larvalentwicklung aus (Shirley et al. 1987, Laughlin & French 1989, Giménez & Anger 2003).

Ob die Embryonalentwicklung von *Hyas araneus* ein- oder zweijährig ist, hängt vor allem von der Habitatterperatur und der korrelierenden Planktonblüte ab. Es stellt sich die Frage, ob die Embryonalentwicklung durch eine gesteigerte Temperatur positiv beeinflusst wird, und ab welcher Temperatur die Embryonalentwicklung gestört ist. Der Vergleich der Helgolandmegalopen von 2008 (Publikation II) mit denen von 1981/82 (Anger 1983, Anger et al. 1983) (Abb. 4.2.7.) verdeutlichte, dass die Larven vermutlich fähig waren sich in 30 Jahren an eine Erwärmung anzupassen. Können sich die Embryonen auch in solch einer kurzen Zeit an sich ändernde Umweltbedingungen

anpassen oder ist die Entwicklung vornehmlich durch die genetische Ausstattung der Elterngeneration vorbestimmt? Diese Fragen sollten in künftigen Untersuchungen am Modellorganismus *Hyas araneus* erforscht werden.

In dieser Arbeit wurde veranschaulicht, dass sowohl die Adulten als auch die larvalen Stadien von *H. araneus* der Helgolandpopulation fähig waren, eine Erwärmung zu tolerieren (Publikationen I, II). Die Larven von Helgoland konnten sich zudem vermutlich an die gestiegenen Temperaturen innerhalb der letzten 30 Jahre anpassen (Publikation II). Die synergistischen Effekte von Erwärmung und erhöhten CO₂-Konzentrationen hatten dagegen negative Effekte bei dieser Population. Beispielsweise reduzierte sich die obere kritische Temperatur der adulten Krebse bei CO₂-Konzentrationen von 710 ppm, wie sie für das Jahr 2100 erwartet werden, von über 25 °C auf 23.5 °C (Publikation I). Zudem waren die Larven aus Helgoland bei 3000 ppm CO₂ bereits bei 9 und 15 °C in ihrer Fitness, Entwicklung und Kalzifizierung gestört (Publikation II). Ausgehend von jährlichen Maximaltemperaturen in der Helgoländer Reede von über 20 °C und prognostizierten Steigerungen um weitere 2.5 °C in den nächsten 100 Jahren (IPCC 2001) würden die Grenzen des Temperaturtoleranzbereiches voraussichtlich erreicht werden. Scheinbar wird diese Population aber schon jetzt beeinträchtigt, da die Abundanzen um Helgoland stark zurückgegangen sind, wie einheimische Fischer bestätigen. Laut Christiansen (1969) lag das Verbreitungsgebiet von *Hyas araneus* (Abb. 4.3.1. blau und rote Markierung) im Nordostatlantik zwischen dem Englischen Kanal (rote Markierung) bis nach Svalbard (blaue Markierung). Im Englischen Kanal wurden im Jahr 1986 Temperaturen von 6 bis 17 °C ermittelt. Bis zum Jahr 2002 erwärmte sich diese Region bereits auf 9 bis 18 °C (Martin & Planque 2006). Ähnlich wie in der Helgoländer Reede kam es hier in den letzten 100 Jahren zu einer Erhöhung des jährlichen Temperaturmittels um 1 °C (Hawkins et al. 2003). Es ist also anzunehmen, dass *Hyas araneus* in dieser Region auch durch die Erwärmung beeinträchtigt wurde und deren dortige Verbreitung heutzutage fraglich ist (Abb. 4.3.1. rote Markierung). Dies kann durch Beobachtungen von Dr. D'Udekem D'Acoz (Flanders Marine Institute, Belgien; pers. Mitteilung) als auch von Studien über das Makrozoobenthos (Dyer 1985, Maertens 1989, Rees et al. 1999), die den Rückgang von *Hyas araneus* im Englischen Kanal belegen, bestätigt werden. Die synergistischen Effekte von wärmeren Temperaturen und erhöhten CO₂-Konzentrationen reduzierten die Temperaturtoleranz der Art noch weiter (Publikationen I, II), wodurch sich die

Verbreitung vermutlich in nördlichere Gebiete als dem Englischen Kanal und die Region um Helgoland verschoben wird (Abb 4.3.1. rot-blauer Pfeil).

Die *H. araneus* der Svalbardpopulation zeigen eine andere Temperaturtoleranz als die der Helgolandpopulation. Sie reagierten äußerst negativ auf eine Temperaturerhöhung (Publikation II, III, IV) und würden bei einer fortschreitenden Ozeanerwärmung bis 9 °C bereits an ihre Toleranzgrenze stoßen. Außerdem waren die Fitness und die Kalzifizierung der Svalbardmegalopen auch bei 3 °C gestört, was auf eine untere Temperaturtoleranzgrenze bei 3 °C schließen lässt (Publikation II, III). Die Verbreitungsgrenze dieser Art liegt bei Svalbard (79°N) und ist laut Christiansen (1969) nicht in der Region der östlichen grönländischen Küste verbreitet. Christiansen erklärt dies mit den dort vorherrschenden kälteren Temperaturen, der kurzen Planktonblüte und den niedrigen Salinitäten (Christiansen 1982). Es kam jedoch auch an der grönländischen Küste in den letzten Jahren zu steigenden Temperaturen (Buch et al. 2005). Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die dort vorkommende Planktongemeinschaft daraufhin verändert hat. Zudem zeigen diverse Studien Salinitätsschwankungen in der Grönländischen See von 5 ‰, zwischen 30 und 35 ‰ (Aagaard et al. 1991, Schneider & Budéus 1994, De Vernal et al. 2000). Dies sind Werte wie sie auch um Helgoland und Svalbard vorkommen (Becker et al. 1992, Beare et al. 2002, Svendsen et al. 2002). Daraus lässt sich schließen, dass die Besiedlung der Grönländischen Küste inzwischen durchaus wahrscheinlich ist (Abb. 4.3.1. blau-gelber Pfeil). Dies könnte durch die lange Entwicklungszeit der Larven ermöglicht worden sein, da sie sich so länger in der Wassersäule aufhalten und in neue Gebiete verdriften könnten (Thorson 1961).



Abb. 4.3.1. Verbreitung von *Hyas araneus*. Die blaue und rote Markierung zeigen die ursprüngliche Verbreitung nach Christiansen 1969, wobei rote Bereiche mittlerweile vermutlich nicht mehr besiedelt werden. Abwanderung wird signalisiert durch rot-blauen Pfeil. Die gelbe Markierung zeigt neue Möglichkeiten der Besiedlung durch Svalbardkrebse (blau-gelber Pfeil).

Diese Arbeit verdeutlichte, dass sich der Klimawandel auf *Hyas araneus*, eine kalt-eurytherme Krebsart, die sowohl in der gemäßigten als auch Sub-Arktischen Region verbreitet ist, auswirken wird. Dabei wurde zum einen gezeigt, dass die synergistischen Effekte von erhöhten CO₂-Konzentrationen und Erwärmung unterschiedlichen Einfluss, in Abhängigkeit von der Population, auf die Temperaturtoleranz und Fitnessindikatoren der Organismen haben. Die gewonnenen Ergebnisse warfen zudem auch neue Fragen auf, insbesondere zu physiologischen Mechanismen und zur Anpassungsfähigkeit der Population. In zukünftigen Studien sollten diese Fragen an *Hyas araneus*, einem Modellorganismus, der sich hervorragend für vergleichende Untersuchungen einer Crustaceenart aus verschiedenen Klimazonen eignet, weiter verfolgt werden.

5. Literaturverzeichnis

- Aagaard K, Fahrbach E, Meincke J, Swift JH (1991) Saline outflow from the Arctic Ocean: its contribution to the deep waters of the Greenland, Norwegian, and Iceland Seas. *J Geophys Res* 96: 433-441
- Amato CG, Waugh DA, Feldmann RM, Schweitzer CE (2008) Effect of calcification on cuticle density in decapods: a key to lifestyle. *J Crust Biol* 28: 587-595
- Andersson A, Mackenzie FT, Bates NR (2008) Life in the margin: implications of ocean acidification on Mg-calcite, high latitude and cold-water marine calcifiers. *Mar Ecol Prog Ser* 373:265-273
- Anger K (1983) Temperature and the larval development of *Hyas araneus* L. (Decapoda: Majidae); extrapolation of laboratory data to field conditions. *J Exp Mar Biol Ecol* 69: 203-215
- Anger K (1984a) Influence of starvation on moult cycle and morphogenesis of *Hyas araneus* larvae (Decapoda, Majidae). *Helg Meeresunters* 38: 21-33
- Anger K (1984b) Gain and loss of particulate organic and inorganic matter in larval and juvenile spider crabs (*Hyas araneus*) during growth and exuvation. *Helgoländer Meeresunters* 38:107-122
- Anger K (1985) Influence of salinity on larval development of the spider crab, *Hyas araneus*, reared in the laboratory. In: Gray JS, Christiansen ME (eds) *Marine biology of polar regions and effects of stress on marine organisms*. Wiley, Chichester, 463-474
- Anger K (1987) Energetics of spider crab *Hyas araneus* megalopa in relation to temperature and the moult cycle. *Mar Ecol Prog Ser* 36:115-122
- Anger K (1988) Growth and elemental composition (C, N, H) in *Inachus dorsettensis* (Decapoda: Majidae) larvae reared in the laboratory. *Mar Biol* 99: 255-260
- Anger K (1991) Developmental changes in the bioenergetics of decapod larvae. *Mem Queensl Mus* 31:289-308
- Anger K (1998) Patterns of growth and chemical composition in decapod crustacean larvae. *Invertebrate Reprod Dev* 33: 159-176
- Anger K (2001) The biology of decapod crustacean larvae. *Crustacean Issue* 14. A.A. Balkema Publishers, Swets and Zeitlinger, Lisse, p 1-420
- Anger K, Dawirs RR (1982) Elemental composition (C,N,H) and energy in growing and starving larvae of *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). *Fish Bull* 80: 419-433

- Anger K, Dietrich A (1984) Feeding rates and gross growth efficiencies in *Hyas araneus* L. larvae (Decapoda: Majidae) reared in the laboratory. J Exp Mar Biol Ecol 77: 169-181
- Anger K, Harms J (1990) Elemental (CHN) and proximate biochemical composition of decapod crustacean larvae. Comp Biochem Physiol 97:69-80
- Anger K, Ismael D (1997) Growth and elemental composition (C, N, H) in larvae and early juvenile of a South American salt marsh crab, *Chasmagnathus granulata* (Decapoda: Grapsidae). Mangroves and Salt Marshes 1: 219-227
- Anger K, Nair KKC (1979) Laboratory experiments on the larval development of *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). Helgol Meeresunters 32:36-54
- Anger K, Spindler K-D (1987) Energetics, moult cycle and ecdysteroid titers in spider crab (*Hyas araneus*) larvae starved after the D₀ threshold. Mar Biol 94: 367-375
- Anger K, Riesebeck K, Püschel C (2000) Effects of salinity on larval and early juvenile growth of an extremely euryhaline crab species, *Armases miersii* (Decapoda: Grapsidae). Hydrobiologia 426: 159-166
- Anger K, Harms J, Püschel C, Seeger B (1989) Physiological and biochemical changes during the larval development of a brachyuran crab reared under constant conditions in the laboratory. Helgoländer Meeresunters 43:225-244
- Anger K, Laasch N, Püschel C, Schorn F (1983) Changes in biomass and chemical composition of spider crab (*Hyas araneus*) larvae reared in the laboratory. Mar Ecol Prog Ser 12:91-101
- Anger K, Lovrich GA, Thatje S, Calcagno JA (2004) Larval and early juvenile development of *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda: Anomura: Lithodidae) reared at different temperatures in the laboratory. J Exp Mar Biol Ecol 306: 217-230
- Anger K, Thatje S, Lovrich G, Calcagno J (2003) Larval and early juvenile development of *Paralomis granulosa* reared at different temperatures: tolerance of cold and food limitation in a lithodid crab from high latitudes. Mar Ecol Prog Ser 253:243-251
- Arnold KE, Findlay HS, Spicer JI, Daniels CL, Boothroyd D (2009) Effect of CO₂-related acidification on aspects of the larval development of the European lobster, *Homarus gammarus* (L.). Biogeosciences 6:1747-1754
- Baeza JA, Fernández M (2002) Active brood care in *Cancer setosus* (Crustacea: Decapoda): the relationship between female behaviour, embryo oxygen

- consumption and the cost of brooding. *Funct Ecol* 16: 241-251
- Beare DJ, Batten S, Edwards M, Reid DG (2002) Prevalence of boreal Atlantic, temperate Atlantic and neritic zooplankton in the North Sea between 1958 and 1998 in relation to temperature, salinity, stratification intensity and Atlantic inflow. *J Sea Res* 48: 29-49
- Becker GA, Dick S, Dippner JW (1992) Hydrography of the German Bight. *Mar Ecol Prog Ser* 91: 9-18
- Berge JA, Bjerkeng B, Pettersen O, Schaanning MT, Øxnevad S (2006) Effects of increased sea water concentrations of CO₂ on growth of the bivalve *Mytilus edulis* L.. *Chemosphere* 62: 681-687
- Brante A, Fernández M, Eckerle L, Mark F, Pörtner HO, Arntz W (2003) Reproductive investment in the crab *Cancer setosus* along a latitudinal cline: egg production, embryo losses and embryo ventilation. *Mar Ecol Prog Ser* 251: 221-232
- Brevard ME, Duong TQ, King JA, Ferris CF (2003) Changes in MRI signal intensity during hypercapnic challenge under conscious and anesthetized conditions. *Mag Res Imag* 21: 995-1001
- Buch E, Pedersen SA, Ribergaard MH (2005) Ecosystem variability in West Greenland waters. *J Northw Atl Fish Sci* 34: 13-28
- Caldeira K, Wickett ME (2003) Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425:365
- Caldeira K, Wickett ME (2005) Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean, *J. Geophys. Res.*, 110, C09S04, doi:10.1029/2004JC002671
- Cameron JN (1985a) Compensation of hypercapnic acidosis in the aquatic blue crab, *Callinectes sapidus*: the predominance of external sea water over carapace carbonate as the proton sink. *J Exp Biol* 114:197-206
- Cameron JN (1985b) Post-moult calcification in the blue crab (*Callinectes sapidus*): relationships between apparent net H⁺ excretion, calcium and bicarbonate. *J Exp Biol* 119:275-285
- Cameron JN, Wood CM (1985) Apparent H⁺ excretion and CO₂ dynamics accompanying carapace mineralization in the blue crab (*Callinectes sapidus*) following moulting. *J Exp Biol* 114:181-196
- Camus L, Jones MB, Børseth JF, Regoli F, Depledge MH (2002) Heart rate, respiration and total oxyradical scavenging capacity of the Arctic spider crab, *Hyas araneus*, following exposure to polycyclic aromatic compounds via sediment

- and injection. *Aqua Toxic* 61: 1-13
- Castilho PC, Martins IA, Bianchini A (2001) Gill Na⁺,K⁺-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 256: 215-227
- Chang ES, Prestwich GD, Bruce MJ (1990) Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem Biophys Res Commun* 171: 818-826
- Charmantier G (1998) Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. *Inv Reprod Dev* 33: 177-190
- Childress JJ, Nygaard M (1974) Chemical composition buoyancy of midwater crustaceans as function of depth of occurrence off southern california. *Mar Biol* 27:225-238
- Christiansen ME (Ed.) (1969) Crustacea Decapoda Brachyura, in: *Marine Invertebrates of Scandinavia*, No. 2, Universitetsforlaget, Oslo
- Christiansen ME (1982) A review of the distribution of Crustacea Decapoda Brachyura in the northeast Atlantic. *Quad lab Tecnol Pesca* 3: 344-354
- Clavier J, Castets M-D, Bastian T, Hily C, Boucher G, Chauvaud L (2009) An amphibious mode of life in the intertidal zone: aerial and underwater contribution of *Chthamalus montagui* to CO₂ fluxes. *Mar Ecol Prog Ser* 375: 185-194
- Coblentz FE, Shafer TH, Roer RD (1998) Cuticular proteins from the blue crab alter in vitro calcium carbonate mineralization. *Comp Biochem Physiol B* 121: 349-360
- Corotto FS, Holliday CW (1996) Branchial Na, K-ATPase and Osmoregulation in the Purple Shore Crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). *Comp Biochem Physiol* 113: 361-368
- Cuculescu M, Hyde D, Bowler K (1998) Thermal tolerance of two species of marine crab, *Cancer pagurus* and *Carcinus maenas*. *J Therm Biol* 23: 107-110
- Dahlhoff A, Somero GN (1993) Effects of temperature on mitochondria from abalone (genus *Haliotis*): adaptive plasticity and its limits. *J Exp Biol* 185: 151-168
- Dawirs RR (1980) Elemental composition (C,N,H) in larval and crab-1 stages of *Pagurus bernhardus* (Decapoda, Paguridae) and *Carcinus maenas* (Decapoda, Portunidae). *Mar Biol* 57:17-23
- Dawirs RR (1981) Elemental composition (C, N, H) and energy in the development of *Pagurus bernhardus* (Decapoda: Paguridae) Megalopa. *Mar Biol* 64: 117-123

- Dawirs RR (1987) Influence of limited starvation periods on growth and elemental composition (C, N, H) of *Carcinus maenas* (Decapoda: Portunidae) larvae reared in the laboratory. *Mar Biol* 93: 543-549
- Dawirs RR, Dietrich A (1986) Temperature and laboratory feeding rates in *Carcinus maenas* L. (Decapoda: Portunidae) larvae from hatching through metamorphosis. *J Exp Mar Biol Ecol* 99: 133-147
- DeFur PL, Mangum CP (1979) The effects of environmental variables on the heart rates of invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 62: 283-294
- Deigweiher K, Koschnick N, Pörtner HO, Lucassen M (2008) Acclimation of ion regulatory capacities in gills of marine fish under environmental hypercapnia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1660-R1679
- Derby CD, Ache BW, Carr WES (1987) Purinergic modulation in the brain of the spiny lobster. *Brain Res* 421: 57-64
- De Vernal A, Hillaire-Marcel C (2000) Sea-ice cover, sea-surface salinity and halothermocline structure of the northwest North Atlantic: modern versus full glacial conditions. *Quat Sci Rev* 19: 65-85
- De Wachter B, McMahon BR (1996) Temperature effects on heart performance and regional hemolymph flow in the crab *Cancer magister*. *Comp Biochem Physiol* 114: 27-33
- Dineen Jr. JF, Hines AH (1994) Effects of salinity and adult extract on settlement of the oligohaline barnacle *Balanus subalbidus*. *Mar Biol* 119: 423-430
- Dupont S, Havenhand J, Thorndyke W, Peck L, Thorndyke M (2008) Near-future level of CO₂-driven ocean acidification radically affects larval survival and development in the brittlestar *Ophiothrix fragilis*. *Mar Ecol Prog Ser* 373:285-294
- Dyer MF (1985) The distribution of *Hyas araneus* (L.) and *Hyas coarctatus* Leach (Crustacea: Decapoda: Brachyura) in the North Sea and the Svalbard region. *J Mar Biol Ass UK* 65: 195-201
- Egilsdottir H, Spicer JI, Rundle SD (2009) The effect of CO₂ acidified sea water and reduced salinity on aspects of the embryonic development of the amphipod *Echinogammarus marinus* (Leach). *Mar Poll Bull* 58:1187-1191
- Eshky AA, Taylor AC, Atkinson RJA (1996) The Effects of temperature on aspects of respiratory physiology of the semi-terrestrial crabs, *Uca inversa* (Hoffmann) and *Metopograpsus messor* (Forskål) from the red sea. *Comp Biochem Physiol* 114:

297-304

- Fabry VJ, Seibel BA, Feely RA, Orr JC (2008) Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES J Mar Sci* 65:414-432
- Feely RA, Sabine CL, Lee K, Berelson W, Kleypass J, Fabry VJ, Millero FJ (2004) Impact of Anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the Oceans. *Science* 305:362-366
- Fernández M, Bock C, Pörtner HO (2000) The cost of being a caring mother: the ignored factor in the reproduction of marine invertebrates. *Ecol Lett* 3: 487-494
- Findlay HS, Kendall MA, Spicer JJ, Widdicombe S (2009) Future high CO₂ in the intertidal may comprise adult barnacle *Semibalanus balanoides* survival and embryonic development rate. *Mar Ecol Prog Ser* 389:193-202
- Findlay HS, Kendall MA, Spicer JJ, Widdicombe S (2010) Relative influences of ocean acidification and temperature on intertidal barnacle post-larvae at the northern edge of their geographic distribution. *Estuar Coast Shelf Sci* 86:675-682
- Flik G, Verboost PM, Atsam W (1994) Calcium transport in gill plasma membranes of the crab *Carcinus maenas*: evidence for carriers driven by ATP and a Na⁺ gradient. *J Exp Biol* 195:109-122
- Frank KT, Perry RI, Drinkwater KF (1990) Predicted responses of Northwest Atlantic invertebrate and fish stocks to CO₂-induced climate change. *Trans Am Fish Soc* 119: 353-365
- Frederich M, Pörtner HO (2000) Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: R1531-R1538
- Frederich M, Sartoris FJ, Arntz WE, Pörtner HO (2000) Haemolymph Mg²⁺ regulation in decapod crustaceans: Physiological correlates and ecological consequences in polar areas. *J Exp Biol* 203: 1383-1393
- García-Guerrero M, Villarreal H, Racotta IS (2003) Effect of temperature on lipids, proteins, and carbohydrates levels during development from egg extrusion to juvenile stage of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Comp Biochem Physiol A* 135: 147-154
- Giménez L, Anger K (2003) Larval performance in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*, is a consequence of both larval and embryonic experience. *Mar Ecol Prog Ser* 249: 251-264

- Giraud M-M (1981) Carbonic anhydrase activity in the integument of the crab *Carcinus maenas* during the intermolt cycle. *Comp Biochem Physiol* 69:381-387
- Gunthorpe ME, Sikes CS, Wheeler AP (1990) Promotion and inhibition of calcium carbonate crystallization *in vitro* by matrix protein from blue crab exoskeleton. *Biol Bull* 179: 191-200
- Gutowska MA, Melzner F, Pörtner HO, Meier S (2010) Cuttlebone calcification increases during exposure to elevated seawater $p\text{CO}_2$ in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Mar Biol* 157: 1653-1663
- Hamasaki K (2003) Effects of temperature on the egg incubation period, survival and developmental period of larvae of the mud crab *Scylla serrata* (Forskål) (Brachyura: Portunidae) reared in the laboratory. *Aquaculture* 219: 561-572
- Hawkins SJ, Southward AJ, Genner MJ (2003) Detection of environmental change in a marine ecosystem - evidence from the western English Channel. *Sci Total Envir* 310: 245-256
- Hegerl GC, Bindoff NL (2005) Warming the World's Oceans. *Science* 309: 254-255
- Henry RP, Cameron JN (1983) The role of carbonic anhydrase in respiration, ion regulation and acid-base balance in the aquatic crab *Callinectes sapidus* and the terrestrial crab *Gecarcinus lateralis*. *J exp Biol* 103:205-223
- Henry RP, Wheatly MG (1992) Interaction of respiration, ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Am. Zool.* 32, 407-416
- Henry RP, Kormanik GA, Smatresk NJ, Cameron JN (1981) The role of CaCO_3 dissolution as a source of HCO_3^- for the buffering of hypercapnic acidosis in aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *J exp Biol* 94:269-274
- Hilden S, Hokin LE (1975) Active potassium transport coupled to active sodium transport in vesicles reconstituted from purified sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase from the rectal gland of *Squalus acanthias*. *J Biol Chem* 250: 6296-6303
- Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, Steneck RS, Greenfield P, Gomez E, Harvell CD, Sale PF, Edwards AJ, Caldeira K, Knowlton N, Eakin CM, Iglesias-Prieto R, Muthiga N, Bradbury RH, Dubi A, Hatziolos ME (2007) Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science* 318:1737-1742
- Ikeda T (1988) Metabolism and chemical composition of crustaceans from the Antarctic mesopelagic zone. *Deep-Sea Res* 35:1991-2002
- Ikeda T, Skjoldal HR (1989) Metabolism and elemental composition of zooplankton

- from the Barents Sea during early Arctic summer. *Mar Biol* 100:173-183
- IPCC (2001) *Climate Change 2001, Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge
- IPCC (2007) *Climate Change 2007, Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge
- Ismael D, Anger K, Moreira GS (1997) Influence of temperature on larval survival, development, and respiration in *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda). *Helgoländer Meeresunters* 51: 463-475
- Jansen JM, Pronker AE, Bonga SW, Hummel H (2007) *Macoma balthica* in Spain, a few decades back in climate history. *J Exp Mar Biol Ecol* 344: 161-169
- Jensen GC, Armstrong DA (1989) Biennial reproductive cycle of blue king crab, *Paralithodes platypus*, at the Pribilof Island, Alaska and comparison to a congener, *P. camtschatica*. *Can J fish Aquat Sci* 46: 932-940
- Johnnessen OM, Bengtsson L, Miles MW, Kuzmina SI, Semenov VA, Alekseev GV, Nagurnyi AP, Zakharov VF, Bobylev LP, Pettersson LH, Hasselmann K, Cattle HP (2004) Arctic climate change: observed and modelled temperature and sea-ice variability. *Tellus* 56: 328-341
- Johnson CL (2003) Ecdysteroids in the oceanic copepod *Calanus pacificus*: variation during molt cycle and change associated with diapause. *Mar Ecol Prog Ser* 257: 159-165
- Körtzinger A (2010) Betrachtung aus meereschemischer Perspektive. Der globale Kohlenstoffkreislauf im Anthropozän. *Chem Unserer Zeit* 44: 118-129
- Kunisch M, Anger K (1984) Variation in development and growth rates of larval and juvenile spider crabs *Hyas araneus* reared in the laboratory. *Mar Ecol Prog Ser* 15:293-301
- Kurihara H (2008) Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Mar Ecol Prog Ser* 373:275-284
- Kurihara H, Kato S, Ishimatsu A (2007) Effects of increased seawater pCO₂ on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat Biol* 1: 91-98
- Kurihara H, Shimode S, Shirayama Y (2004) Effects of raised CO₂ concentration on the egg production rate and early development of two marine copepods (*Arctica steueri* and *Acartia erythraea*). *Mar Poll Bull* 49:721-727
- Laird CE, Haefner Jr PA (1976) Effects of intrinsic and environmental factors on

- oxygen consumption in the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. J Exp Mar Biol Ecol 22: 171-178
- Lannig G, Bock C, Sartoris FJ, Pörtner HO (2004) Oxygen limitation of thermal tolerance in cod, *Gadus morhua* L., studied by magnetic resonance imaging and on-line venous oxygen monitoring. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287: R902-R910
- Laughlin Jr RB, French W (1989) Interactions between temperature and salinity during brooding on subsequent zoeal development of the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*. Mar Biol 102: 377-386
- Li HY, Hong SY (2007) The effect of temperature and salinity on survival and growth of *Crangon uritai* (Decapoda: Crangonidae) larvae reared in the laboratory. Mar Ecol 28: 288-295
- Lim BK, Hirayama K (1991) Growth and elemental composition (C, N, P) during larval developmental stages of mass-cultured swimming crab *Portunus trituberculatus*. Mar Ecol Prog Ser 78:131-137
- Lópes Mananes AA, Meligeni CD, Goldemberg AL (2002) Response to environmental salinity of Na⁺-K⁺ ATPase activity in individual gills of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. J Exp Mar Biol Ecol 274: 75-85
- Lovrich GA, Thatje S, Calcagno JA, Anger K, Kaffenberger A (2003) Changes in biomass and chemical composition during lecithotrophic larval development of the Southern king crab, *Lithodes santolla* (Molina). J Exp Mar Biol Ecol 288: 65-79
- Maertens D (1989) Ecological monitoring of the new dumping area on the belgian continental shelf. Prog Belgian Oceanogr Res, (Editor G. Pichot), Brussels, Belgium
- Mantel LH (1985) Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. Am Zool 25: 253-263
- Mark FC, Bock C, Pörtner HO (2002) Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and ³¹P-MRS. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 283: R1254-R1262
- Martin J, Planque (2006) Variability in the onset of hatching of *Maja brachydactyla* Balss, 1922 (Brachyura: Majidae) in the English Channel in relation to sea temperature. Invertebrate Reprod Dev 49: 143-150
- Maurer G, Wilkens JL, Grieshaber MK (2008) Modulatory effects of adenosine and

- adenine nucleotides on different heart preparations of the American lobster, *Homarus americanus*. J Exp Biol 211: 661-670
- Mayer DJ, Matthews C, Cook K, Zuur AF, Hay S (2007) CO₂-induced acidification affects hatching success in *Calanus finmarchicus*. Mar Ecol Prog Ser 350:91-97
- McDonald MR, McClintock JB, Amsler CD, Rittschof D, Angus RA, Orihuela B, Lutostanski K (2009) Effects of ocean acidification over the life history of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*. Mar Ecol Prog Ser 385: 179-187
- Melzner F, Göbel S, Langenbuch M, Gutowska MA, Pörtner HO, Lucassen M (2009a) Swimming performance in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) following long-term (4-12 months) acclimation to elevated sea water p CO₂. Aquat Toxicol 92: 30-37
- Melzner F, Gutowska MA, Langenbuch M, Dupont S, Lucassen M, Thorndyke MC, Bleich M, Pörtner HO (2009b) Physiological basis for high CO₂ tolerance in marine ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? Biogeosciences 6: 1-9
- Metzger R, Sartoris FJ, Langenbuch M, Pörtner HO (2007) Influence of elevated CO₂ concentrations on thermal tolerance of the edible crab *Cancer pagurus*. J Therm Biol 32: 144-151
- Michaelidis B, Ouzounis C, Palaras A, Pörtner HO (2005) Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. Mar Ecol Prog Ser 293:109-118
- Miles H, Widdicombe S, Spicer JJ, Hall-Spencer J (2007) Effects of anthropogenic seawater acidification on acid-base balance in the sea urchin *Psammechinus miliaris*. Mar Poll Bull 54:89-96
- Minagawa M, Chiu J-R, Murano M (1993) Developmental changes in body weight and elemental composition of laboratory-reared larvae of the red frog crab, *Ranina ranina* (Decapoda: Brachyura). Mar Biol 116:399-406
- Morley SA, Hirse T, Pörtner HO, Peck LS (2009a) Geographical variation in thermal tolerance within Southern Ocean marine ectotherms. Comp Biochem Physiol A 153: 154-161
- Morley SA, Tan KS, Day RW, Martin SM, Pörtner HO, Peck LS (2009b) Thermal dependency of burrowing in three species the bivalves genus *Laternula*: a latitudinal comparison. Mar Biol 156: 1977-1984
- Nakanishi T (1981) The effect of temperature on growth, survival and oxygen consumption of larvae and post-larvae of *Paralithodes brevipes* (Decapoda:

- Anomura). Bull Jap Sea Reg Fish Res Lab 32:49-56
- Neufeld GJ, Holliday CW, Pritchard JB (1980) Salinity adaption of gill Na, K-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. J Exp Zool 211: 215-224
- Neufeld DS, Cameron JN (1993) Transepithelial movement of calcium in crustaceans. J Exp Biol 184:1-16
- Normant M, Chrobak M, Szaniawska A (2002) Energy value and chemical composition (CHN) of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Grapsidae) from the Baltic Sea. Thermochimica Acta 394: 233-237
- Okamoto K (1993) Influence of temperature on survival and growth of larvae of the giant spider crab *Macrocheira kaempferi* (Crustacea, Decapoda, Majidae). Nippon Suisan Gakkaishi 59: 419-424
- O'Leary Amsler M, George RY (1984) The effect of temperature on the oxygen consumption and development rate of the embryos of *Callinectes sapidus* Rathbun. J Exp Mar Biol Ecol 82: 221-229
- Orr JC, Fabry VJ, Aumont O, Bopp L, Doney SC, Feely RA, Gnanadesikan A, Gruber N, Ishida A, Joos F, Key RM, Lindsay K, Maier-Reimer E, Matear R, Monfray P, Mouchet A, Najjar RG, Plattner G-K, Rodgers KB, Sabine CL, Sarmiento JL, Schlitzer R, Slater RD, Totterdell IJ, Weirig M-F, Yamanaka Y, Yool A (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. Nature 437: 681-686
- Overpeck J, Hughen K, Hardy D, Bradley R, Case R, Douglas M, Finney B, Gajewski K, Jacoby G, Jennings A, Lamoureux S, Lasca A, MacDonald G, Moore J, Retelle M, Smith S, Wolfe A, Zielinski G (1997) Arctic Environmental Change of the Last Four Centuries. Science 278: 1251- 1256
- Passano LM (1961) The regulation of crustacean metamorphosis. Am Zoologist 1: 89-95
- Peck LS, Conway LZ (2000) The myth of metabolic cold adaptation: oxygen consumption in stenothermal Antarctic bivalves. Geol Soc, London, Spec Publ 177: 441-450
- Peck LS, Webb KE, Bailey DM (2004) Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species. Funct Ecol 18: 625-630
- Peck LS, Clark MS, Morley SA, Massey A, Rossetti H (2009) Animal temperature limits and ecological relevance: effects of size, activity and rates of change. Funct Ecol 23: 248-256

- Petersen S (1995) The embryonic development of *Hyas araneus* L. (Decapoda, Majidae): effects of temperature. *Sarsia* 80: 193-198
- Petersen S, Anger K (1997) Chemical and physiological changes during the embryonic development of the spider crab, *Hyas araneus* L. (Decapoda: Majidae). *Comp Biochem Physiol* 117: 299-306
- Pörtner HO (2006) Climate-dependent evolution of Antarctic ectotherms: an integrative analysis. *Deep-Sea Res II* 53: 1071-1104
- Pörtner HO (2008) Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar Ecol Prog Ser* 373:203-217
- Pörtner HO (2010) Oxygen and capacity limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate related stressors in marine ecosystems. *J Exp Biol* 213: 881-893
- Pörtner HO, Farrell AP (2008) Physiology and climate change. *Science* 322 (5902): 690-692
- Pörtner HO, Knust R (2007) Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science* 315: 95-97
- Pörtner HO, Langenbuch M, Reipschläger A (2004) Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *J Oceanography* 60: 705-718
- Pörtner HO, Langenbuch M, Michaelidis B (2005) Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: From Earth history to global change. *J Geophys Res* 110: C09S10, doi:10.1029/2004JC002561
- Pratoomchat B, Sawangwong P, Guedes R, De Lurdes Reis M, Machado J (2002a) Cuticle ultrastructure changes in the crab *Scylla serrata* over the molt cycle. *J Exp Zool* 293: 414-426
- Pratoomchat B, Sawangwong P, Pakkong P, Machado J (2002b) Organic and inorganic compound variations in haemolymph, epidermal tissue and cuticle over the molt cycle in *Scylla serrata* (Decapoda). *Comp Biochem Physiol A* 131: 243-255
- Pratoomchar B, Sawangwong P, Machado J (2003) Effects of controlled pH on organic and inorganic composition in haemolymph, epidermal tissue and cuticle of mud crab *Scylla serrata*. *J Exp Zool* 295: 47-56
- Qiu J-W, Qian P-Y (1999) Tolerance of the baranle *Balanus amphitrite amphitrite* to salinity and temperautre stress: effects of previous experience. *Mar Ecol Prog Ser* 188: 123-132

- Reipschläger A, Nilsson GE, Pörtner HO (1997) A role for adenosine in metabolic depression in the marine invertebrate *Sipunculus nudus*. *Am J Phys* 272: R350-R356
- Rees HL, Pendle MA, Waldock R, Limpenny DS, Boyd SE (1999) A comparison of benthic biodiversity in the North Sea, English Channel, and Celtic Seas. *J Mar Sci* 56: 228-246
- Roca JR, Wansard G (1997) Temperature influence on development and calcification of *Herpetocypris brevicaudata* Kaufmann, 1900 (Crustacea:Ostracoda) under experimental conditions. *Hydrobiologia* 347: 91-95
- Roer R, Dillaman R (1984) The structure and calcification of the crustacean cuticle. *Amer Zool* 24: 893-909
- Sabine CL, Feely RA, Gruber N, Key RM, Lee K, Bullister JL, Wanninkhof R, Wong CS, Wallace DWR, Tilbrook B, Millero FJ, Peng T-H, Kozyr A, Ono T, Rios AF (2004) The Oceanic Sink for Anthropogenic CO₂. *Science* 305: 367-371
- Schneider W, Budéus G (1994) The North East Water polynya (Greenland Sea). I. A physical concept of its generation. *Polar Biol* 14: 1-9
- Shirley SM, Shirley TC, Rice SD (1987) Latitudinal variation in the Dungeness crab, *Cancer magister*: zoeal morphology explained by incubation temperature. *Mar Biol* 95: 371-376
- Sokolova IM, Pörtner HO (2003) Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. *J Exp Biol* 206: 195-207
- Somero GN (2002) Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integ Comp Biol* 42: 780-789
- Spaargaren DH (1980) Hydrodynamic properties of benthic marine Crustacea. II. Energy requirements for maintaining vertical position. *Mar Ecol Prog Ser* 2: 153-156
- Spindler K-D, Anger K (1986) Ecdysteroid Levels during the Larval Development of the Spider Crab *Hyas araneus*. *Gener Comp Endocrin* 64: 122-128
- Starr M, Therriault J-C, Conan GY, Comeau M, Robichaud G (1994) Larval release in a sub-euphotic zone invertebrate triggered by sinking phytoplankton particles. *J Plankton Res* 16: 1137-1147
- Stegen E, Grieshaber MK (2001) Adenosine increases ventilation rate, cardiac performance and haemolymph velocity in the American lobster *Homarus*

- americanus*. J Exp Biol 204: 947-957
- Steinacher M, Joos F, Frölicher TL, Plattner G-K, Doney SC (2009) Imminent ocean acidification in the Arctic projected with the NCAR global coupled carbon cycle-climate model. Biogeosciences 6: 515-533
- Stillman JH (2002) Causes and Consequences of thermal tolerance limits in rocky intertidal porcelain crabs, genus *Petrolisthes*. Integ Comp Biol 42: 790-796
- Stillman JH, Somero GN (1996) Adaptation to temperature stress and aerial exposure in congeneric species of intertidal porcelain crabs (genus *Petrolisthes*): Correlation of physiology, biochemistry and morphology with vertical distribution, J Exp Biol 199: 1845-1855.
- Svendsen H, Byszczynska-Møller A, Hagen JO, Lefauconnier B, Tverberg V, Gerland S, Ørbæk JB, Bischof K, Papucci C, Zajackowski M, Azzolini R, Bruland O, Wiencke C, Winther J-G, Dallmann W (2002) The physical environment of Kongsfjorden-Krossfjorden, an Arctic fjord system in Svalbard. Polar Res 21: 133-166
- Taylor AC (1976) The respiratory responses of *Carcinus maenas* to declining oxygen tension. J Exp Biol 65: 309-322
- Taylor EW (1982) Control and co-ordination of ventilation and circulation in crustaceans: responses to hypoxia and exercise. J Exp Biol 100: 289-319
- Taylor DM, Hooper RG, Ennis GP (1985) Biological aspects of the spring breeding migration of snow crabs, *Chionoecetes opilio*, in Bonne Bay, Newfoundland (Canada). Fish B-Noaa 83: 707-711
- Thorson G (1961) Length of pelagic larval life in marine bottom invertebrates as related to larval transport by ocean currents. Publ Am Ass Advmt Sci 67: 455-474
- Torres G, Giménez L, Anger K (2002) Effects of reduced salinity on the biochemical composition (lipid, protein) of zoea 1 decapod crustacean larvae. J Exp Mar Biol Ecol 277: 43-60
- Travis DF (1955) The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus agrus* Latreille. II. Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. Biol Bull 108: 88-112
- Truchot J-P (1984) Water carbonate alkalinity as a determinant of hemolymph acid-base balance in the shore crab, *Carcinus maenas*: a study at two different ambient PCO_2 and PO_2 levels. J Comp Physiol B 154: 601-606
- Vinuesa JH, Ferrari L, Lombardo RJ (1985) Effect of temperature and salinity on larval

- development of southern king crab (*Lithodes antarcticus*). Mar Biol 85: 83-87
- Warner AH, Matheson C (1998) Release of proteases from larvae of the brine shrimp *Artemia franciscana* and their potential role during the molting process. Comp Biochem Physiol 119: 255-263
- Webster SG, Keller (1986) Purification, characterization and amino acid composition of the putative moult-inhibiting hormone (MIH) of *Carcinus maenas*. J Comp Physiol B 156: 617-624
- Weiss M, Heilmayer O, Brey T, Thatje S (2009) Influence of temperature on the zoeal development and elemental composition of cancrid crab, *Cancer setosus* Molina, 1782 from Pacific South America. J Exp Mar Biol Ecol 376: 48-54
- Wetthey DS, Woodin SA (2008) Ecological hindcasting of biogeographic responses to climate change in the European intertidal zone. Hydrobiol 606: 139-151
- Wheatly MG (1981) The provision of oxygen to developing eggs by female shore crabs (*Carcinus maenas*). J Mar Biol Ass UK 61: 117-128
- Wheatly MG (1999) Calcium homeostasis in crustacea: the evolving role of branchial, renal, digestive and hypodermal epithelia. J Exp Zool 283: 620-640
- Wickens JF (1984) The effect of reduced pH on carapace calcium, strontium and magnesium levels in rapidly growing prawns (*Penaeus monodon* Fabricius). Aquaculture 41: 49- 60
- Williams EE, Somero GN (1996) Seasonal-, tidal-cycle- and microhabitat-related variation in membrane order of phospholipid vesicles from gills of the intertidal mussel *Mytilus californianus*. J Exp Biol 199: 1587-1596
- Wiltshire KH, Manly BFJ (2004) The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: phytoplankton response. Helgol Mar Res 58: 269-273
- Wolf-Gladrow DA, Riebesell U, Burkhardt S, Bijma J (1999) Direct effects of CO₂ concentration on growth and isotopic composition of marine plankton. Tellus 51: 461-476
- Wootton JT, Pfister CA, Forester JD (2008) Dynamic patterns and ecological impacts of declining ocean pH in a high-resolution multi-year dataset. PNAS 105: 18848-18853
- Worden MK, Clark CM, Conawa M, Qadri SA (2006) Temperature dependence of cardiac performance in the lobster *Homarus americanus*. J Exp Biol 209: 1024-1034
- Zainal KAY, Taylor AC, Atkinson RJA (1992) The effect of temperature and hypoxia

on the respiratory physiology of the squat lobsters, *Munida rugosa* and *Munida sarsi* (Anomura, Galatheidae). *Comp Biochem Physiol* 101A: 557-567

Zhao Y-L, Du N-S, Lai W (1993) Effects of different gradient temperature on embryonic development of the chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea, Decapoda). *Acta Metallurgica Sinica* 14: 49-53

Danksagung

An erster Stelle danke ich ganz herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans O. Pörtner für die Möglichkeit eine so spannende Doktorarbeit machen zu können, seiner Unterstützung meiner Ideen und Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Herzlich danken möchte ich auch Prof. Dr. Wilhelm Hagen für das Zweitgutachten und meinen Prüfern Prof. Dr. Kai Bischof und Dr. Klaus Anger.

Dr. Franz-J. Sartoris und Dr. Christian Bock danke ich für die tolle Unterstützung während meiner Doktorarbeit. Stets ein offenes Ohr für meine Fragen und auch immer die richtigen Antworten parat: „alles wird gut“, „selbständiges arbeiten heißt: selbst und ständig arbeit“. Bei Timo Hirse möchte ich mich ganz herzlich für die tolle Unterstützung trotz seiner wenigen Zeit bedanken.

Ich möchte mich auch besonders bei Dr. Klaus Anger bedanken, der schon frühzeitig meine Begeisterung für Krebslarven wecken konnte und mir die Möglichkeit gegeben hat mich im Keller monatelang auszuleben. Genauso möchte ich Uwe Nettelmann für die schöne Zeit im Keller und der vielen Unterstützung danken.

Bei Dr. Magnus Lucassen und Tina Brenneis möchte ich mich ganz herzlich für die Zeit und Unterstützung im Moli-Labor danken.

Ich möchte Kapitän Charlie Lührs und der Besatzung des Forschungskutters „Uthörn“ für die tolle Woche auf See und das unermüdliche Fangen von Krebsen danken.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an die Mitarbeiter der Biologischen Anstalt Helgoland für die tolle Zeit und Unterstützung während meiner zweimaligen langen Aufenthalte. Vor allem möchte ich ganz herzlich Karin Boos für die langen Statistikabende danken. Ein besonderes Dankeschön geht an Bettina Oppermann und Julia Haafke für die tolle Unterstützung im Labor und Katharina Schoo bei der Konferenzvorbereitung. Besonders liegt mir am Herzen mich bei meinen fleißigen Helfern im Keller zu bedanken: Pauline Dierichsweiler, Stefanie Schnell, Lena Weber, Karoline Schreiber... Ihr wart eine wirklich tolle Unterstützung auch wenn es wieder länger wurde und die Finger schon eingefroren waren.

In Ny Ålesund möchte ich dem Stationsleiter des AWIPEV Marcus Schumacher und der Kings Bay Labormanagerin Elin Austerheim für die Unterstützung auf der Station und den Forschungstauchern Max Schwanitz und Jan N. Knott für das Sammeln und Versorgen der vielen Krebse ganz herzlich danken.

Ich möchte der Arbeitsgruppe Integrative Ökophysiologie für die tollen drei Jahre danken. Besonders meinen Büromädels: Anneli, Heidi und Katharina möchte ich mich sehr für die wirklich tolle Unterstützung bedanken. Ich hatte eine sehr schöne Zeit, vielen Dank für eure Geduld und Hilfe, den leckeren Kuchen und für das viele Lachen und Sprüche klopfen.

Auch Sabine, Nike, Axinja, Mela und Moni möchte ich für die tolle Unterstützung danken.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken und vor allem Jan für die tollen Fotos und das Cover, deine Geduld, Verständnis, Aufmunterung und dass du für mich da bist.

ENDE