

Huminstoffe – totes Material höchst aktiv

Studien über lebenswichtige braune Geopolymere

Christian E.W. STEINBERG & RALPH MENZEL
Humboldt-Universität zu Berlin

Institut für Biologie, Arbeitsgruppe für Gewässer- und Stressökologie
Arboretum, Späthstraße 80/81, 12437 Berlin

Verrückter Wurm als Lehrmeister

Folgende Beobachtung widerspricht den Weisheiten herkömmlicher Toxikologie- und Ökotoxikologie-Lehrbücher: Tiere begeben sich freiwillig in eine stressvolle Umwelt, in der sie dann gezwungen sind, Stoffe aufzunehmen, die sie weder als Nährstoffe oder Energieträger verwerten noch sonst in irgendeiner Weise ausnutzen können. Vielmehr kostet es sogar Energie, diese Stoffe entweder zu verstoffwechseln oder auszuschcheiden. Die aufgewendete Energie muss anschließend durch verstärkte Nahrungsaufnahme nachgeführt oder von normalen Prozessen wie Wachstum oder Vermehrung abgezogen werden. Nach der gängigen Lehrmeinung haben diese Stoffe somit eine negative bis toxische Wirkung auf die exponierten Tiere.¹

Glücklicherweise haben diese Tiere unsere Lehrbücher nicht gelesen, sondern zeigen uns vielmehr die Grenzen bestehender Lehrmeinungen auf. Sie öffnen uns die Augen und geleiten uns zu neuen Erkenntnissen, die möglicherweise später auch mal Lehrmeinungen werden. Die Tiere, die sich so seltsam verhielten, sind die kleinen Fadenwürmer, *Caenorhabditis elegans*, Bewohner von Komposthaufen, die leicht zu kultivieren sind, einen nur kurzen Generationszyklus besitzen und deshalb für viele genetische und molekularbiologische Studien herangezogen werden. Diese pragmatischen Gesichtspunkte waren auch für uns ausschlaggebend, hauptsächlich mit diesen und anderen kurzlebigen Tieren und nicht mit vergleichsweise langlebigen Fischen detaillierte Untersuchungen über die verschiedenen Wirkungen von Huminstoffen durchzuführen. Ähnliche Wirkungen wie bei diesem Fadenwurm sind aber auch bei anderen Organismen, insbesondere bei Wassertieren zu erwarten und auch zu finden, die intensiv mit ihrer huminstoffhaltigen Umwelt in Kontakt sind – wenn man gezielte Versuche zu diesem Thema anstellt. Schauen wir uns folglich einige Studien über Wirkungen von Huminstoffen auf unseren verrückten Wurm sowie wirbellose Wassertiere an, bevor wir die bisher bekannten Effekte auf Fische zusammenfassen.

Doch vor der Wirkung in den Tieren steht die Aufnahme dieser Stoffe. Entgegen einer alten Lehrmeinung, dass Huminstoffe zu groß seien, um von Organismen aufgenommen zu werden, besteht kein Zweifel mehr, dass Huminstoffe über die Haut und/oder über das Futter aufgenommen werden und so in das Körperinnere gelangen. Dieser biologische Befund wird inzwischen auch durch verschiedene umweltchemische Analysen unabhängig von einander bestätigt, wonach die Bausteine dieser Stoffe eine Molekülgröße besitzen, die durchaus im membrangängigen Bereich liegen. Interessant wäre jetzt zu verfolgen, wie lange es dauert, bis das alte Paradigma, Huminstoffe seien nicht membranfähig, aus den einschlägigen Büchern getilgt wird.

Aber nun zu den direkten Wirkungen dieser Stoffe auf oder besser in Tieren: Obwohl der Fadenwurm (Nematode) *C. elegans* seit vielen Generationen im Labor in huminstofffreier Umwelt gezogen wurden und wird, suchten diese Tiere in mehreren unserer Versuche die huminstoffreiche Umgebung aktiv auf. Sie wurden von den Huminstoffen regelrecht angelockt, was ebenfalls durch die Expression von chemosensorischen und olfaktorischen Genen angezeigt wurde. Um die Anziehung durch Huminstoffe zu testen, wurden alte Larven, die unmittelbar vor dem Adultstadium waren, auf Agarplatten gegeben. Die Futterbakterien waren zu Haufen aggregiert und mit steigenden Konzentrationen eines kommerziellen Huminstoffpräparates getränkt. Nach anfänglichem Suchen kristallisiert sich am 3. Versuchstag heraus, dass die Würmer offenbar mittlere Konzentrationen (5 bis 20 mg/L DOC, *dissolved organic carbon* = gelöster organischer

¹ Toxikologie wie auch Ökotoxikologie erwarten traditionell negative Effekte bei Chemikalienexpositionen und wenden deshalb bevorzugt solche Konzentrationen an, die potenzielle positive Effekte im Niedrigkonzentrationsbereich übersehen. Derartige Effekte wurden lange Zeit als unverantwortliche Scharlatanerien abgetan; und da Lehrmeinungen eher biologisch aussterben als durch Überzeugung überwunden werden, bekam man folglich vorgeworfen, man habe Artefakte untersucht, wenn man Aufsätze mit solchen Effekten im Niedrigkonzentrationsbereich veröffentlichen wollte.

Kohlenstoffe, die gängige analytische Einheit von Huminstoffen) an Huminstoffen bevorzugen und dort die meisten Nachkommen bekommen. Insgesamt wurde die Gesamtzahl der Nachkommen weder positiv noch negativ beeinflusst. In früheren Versuchen hatten wir sogar eine hormonähnliche Wirkung von Huminstoffen auf den kleinen Fadenwurm festgestellt, in denen zu meist eine gesteigert Nachkommenzahl auftrat. Übrigens war dies diejenige Arbeit, bei der alle unsere zu Beginn aufgestellten Arbeitshypothesen falsifiziert wurden, die damaligen Doktoranden folglich und anfänglich als unsauber arbeitend beschimpft wurden, wir später, als wir veröffentlichen wollten, bei den Gutachtern und Herausgebern der wissenschaftlichen Zeitschrift zeitaufwändig Vorurteile ausräumen mussten. Gleichwohl war diese "Negativ"-Studie der Startschuss zu unserer intensiven Beschäftigung mit Huminstoffe in ihrer physiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Wirkung auf Wassertiere. Aus negativen Beispielen lernt man immer noch am besten!

Aus vorgegangenen Versuchen mit Fischen, Wasserflöhen und Flohkrebse wussten wir, dass Huminstoffe im Wasser in den exponierten Tieren neben der Fremdhormon-Wirkung zu einer Vielzahl von bekannten Stressreaktionen führt, wie Erhöhung der Stressproteinkonzentrationen, Modulierung der Biotransformations- und Antioxidations-Enzyme oder auch Oxidation von Membranen und Proteinen.

Warum zeigt der Fadenwurm nun dieses seltsame Verhalten? Warum riskiert er, dass seine Membranen durch den Stress verletzt werden? Dieses Verhalten macht auf den ersten Blick und auf der Basis des Lehrbuchwissens keinen Sinn. Wenn man jedoch die Tiere in ihrem gesamten Lebenszyklus anschaut, kommt ein erstaunliches Ergebnis zu Tage: Mit diesem scheinbar widersinnigen Verhalten verlängert der Wurm sein Leben! Inzwischen wissen wir, dass ein milder chemischer Stress durch niedrige bis mittlere Expositionen an Huminstoffen zu einer deutlichen Lebensverlängerung führt. Und mehr noch: Er wird insgesamt widerstandsfähiger gegen eine Reihe von Stressoren! Wir kommen auf diesen Nebeneffekt noch zurück.

Huminstoff ist nicht gleich Huminstoff

Nicht alle Huminstoffqualitäten wirken gleich, wie sicherlich jeder Aquarianer schon leidvoll erfahren hat: Bei der Zugabe irgendwelcher Huminstoffpräparate in das Aquarienwasser blieb unter Umständen der erwünschte Erfolg aus oder kehrte sich sogar in das Gegenteil um. Auch wir haben diesen Effekt in mehreren vergleichenden Untersuchungen herausgefunden und anschließend versucht, bestimmte Strukturelemente für die einzelnen Effekte namhaft zu machen. Huminstoffe lassen sich hinsichtlich ihrer chemischen Struktur nur statistisch beschreiben, da sie ein von Ort zu Ort und von Jahreszeit zu Jahreszeit veränderbares Stoffgemisch sind. Sie sind – wie es so schön heißt – Geopolymere und damit chemisch nicht so einfach wie Proteine, Lipide oder Kohlenhydrate zu charakterisieren.

Um nun Wirkstrukturen in den Huminstoffen zu identifizieren, bieten sich zwei experimentelle Wege an, die sich gegenseitig nicht ausschließen, sondern vielmehr ergänzen.

1. Man testet eine große Anzahl von Huminstoffen, deren chemische Bausteine gut charakterisiert sind und nimmt anschließend eine Regressionsanalyse vor; man stellt eine so genannte Struktur-Wirkungs-Beziehung auf. Dies ist natürlich sehr arbeits- und zeitaufwändig.
2. Man verwendet Einzelkomponenten, die in Huminstoffen vorhanden sind – so genannte Bausteine, oder man modifiziert vorhandene Huminstoffe gezielt, indem man bestimmte Bausteine anreichert. Dies kann man dann machen, wenn man bereits durch eigene Arbeiten oder aus der Literatur positive Verdachtsmomente auf bestimmte Komponenten hat.

Wir sind mit unserem Kompostwurm und den Wasserorganismen beide Wege gegangen. So haben wir – auf der Suche nach alternativen Therapeutika in Aquakultur und Aquaristik – in einer Studie mit 20 verschiedenen, gut charakterisierten Huminstoffen versucht, das Myzelwachstum des parasitären Wasserpilzes *Saprolegnia parasitica* zu unterdrücken oder ihn sogar abzutöten. Abb. 1 zeigt zwei konträre Ergebnisse mit Stoffen die summarisch identisch als "Huminstoffe" bezeichnet werden:

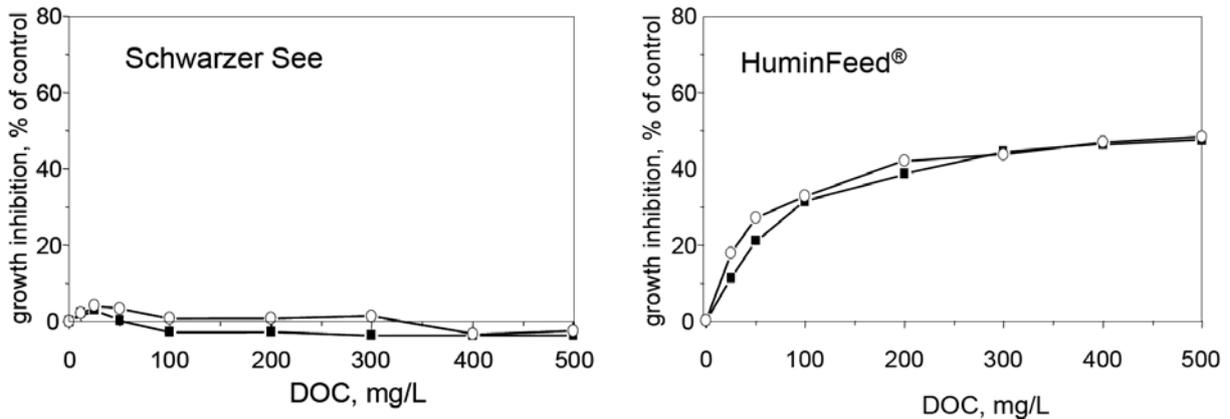


Abb. 1: Wachstumsmodulation von *Saprolegnia parasitica* in Abhängigkeit von zwei unterschiedlichen Huminstoffisolate als DOC: **Links:** ein so genanntes *natural organic matter* (NOM, aus einem Brandenburger See durch Umkehrosmose isoliert); **rechts:** das kommerzielle HuminFeed². **Schwarze Quadrate:** 24h-Exposition; **weiße Kreise:** 48h-Exposition (aus STEINBERG *et al.* 2007). Einzelheiten über HuminFeed sind folgender Website zu entnehmen <http://www.humintech.com/001/environment/information/general.html>, die im November 2008 angeklickt wurde).

HuminFeed bewirkt bereits in niedrigen, gewässerrelevanten Konzentrationen eine messbare Hemmung des Myzelwachstums (Abb. 1, rechts), während das Isolat aus dem Brandenburger See das Wachstum sogar leicht förderte (Abb. 1, links), gleichgültig, wie lange der Versuch dauerte.

Um herauszufinden, ob dieses Phänomen verallgemeinerbar ist, wurde eine mögliche lebensverlängernde Wirkung dieser beiden Präparate mit dem Fadenwurm *C. elegans* überprüft. Das verblüffende Ergebnis ist in Abb. 2 zu finden: HuminFeed wirkt lebensverlängernd, während das Brandenburger Isolat im besten Falle keine Wirkung hatte. Bei der höchsten Konzentration deutet sich sogar eine lebensverkürzende Wirkung an (Abb. 2, links).

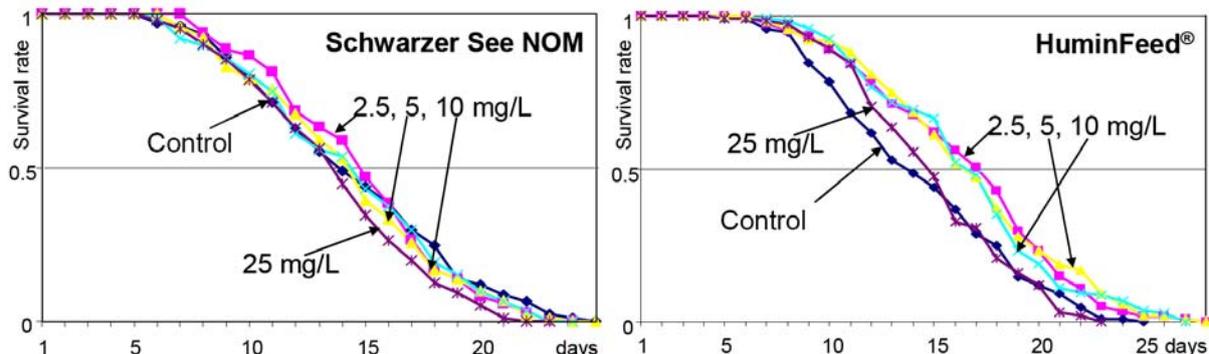


Abb. 2: Eine deutliche Lebensverlängerung trat beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* auf, wenn er gegenüber niedrigen und mittleren Huminstoffkonzentrationen des phenolreichen HuminFeed exponiert wurde (rechter Teil der Abbildung). Wurde dagegen ein nicht weiter aufgetrenntes Isolat von gelösten organischen Stoffen (NOM = *natural organic matter*) aus einem Brandenburger See verwendet (links), trat dieser Effekt nicht auf (aus STEINBERG *et al.* 2007).

Lässt sich dieser Befund, der mit ganzen Huminstoffen gewonnen wurde, nun mit dem oben erwähnten zweiten empirischen Weg bestätigen, indem gezielt mögliche Huminstoffbausteine getestet werden? Gerade abgeschlossene Arbeiten mit einem Baustein von Huminstoffen, nämlich mit dem in vielen Pflanzen, Früchten und Wein weit verbreiteten Polyphenol Quercetin (Name kommt von *Quercus* = Eiche!), haben ferner gezeigt, dass durch diesen milden chemischen Stress nicht nur ein verlängertes Leben, sondern auch Resistenzen sowohl gegenüber erhöhten Temperaturen als auch externen oxidativen Stress erworben werden. Ähnlich wird das erste getestete Huminstoffpräparat gewirkt haben. Es lässt sich leicht vorstellen, dass Organismen mit multiplen Resistenzen gut gegen das Altern gewappnet sind, weil sie für viele mögli-

² Wenn wir in diesem Aufsatz häufiger kommerzielle Huminstoffpräparate namentlich anführen, so besagt das nicht, dass wir diese besonders empfehlen. Die Verwendung solcher Präparate erfolgte aus zwei pragmatischen Gründen: **Erstens** wurden in unseren Versuchen stets größere Mengen verwendet, die als Reinchemikalien, zum Beispiel von der *International Humic Substance Society*, kaum bezahlbar wären. Und **zweitens** sind die chemischen Grundcharakteristika solcher Präparate verfügbar so dass eine statistische Struktur-Wirkungs-Betrachtung versucht werden kann.

che Stresssituationen gewappnet sind.

Aus diesen Beispielen wird deutlich, dass also bestimmte funktionelle Gruppen in den Huminstoffen für die lebensverlängernden und Stressresistenz-Effekte verantwortlich sind. Deshalb ist es unerlässlich, einmal einen Strukturvorschlag über Huminstoffe anzuschauen. Abb. 3 enthält einen didaktisch gelungenen, allerdings für einen Bodenhuminstoff. Im Wasser fehlen die festen Phasen aus Aluminiumsilikaten natürlich. Aus der umfangreichen Testserie von Huminstoffen als Therapeutikum gegen den Pilz *S. parasitica* lässt sich über die Struktur-Wirkungs-Beziehung nun folgende Aussage herausdestillieren: Für den chemischen Stress und – sofern dieser Stress milde ist – auch für die Lebensverlängerung sind im Wesentlichen Polyphenole, Chinone und stabile Radikale verantwortlich, während bioverfügbare Aminosäuren, Aminosucker und Kohlenhydrate keinen oder unter Umständen einen entgegen gesetzten Effekt, nämlich einen lebensverkürzenden, hervorrufen. Sie wirken quasi als Bonbons oder Pralinen und aktivieren solche Stoffwechselwege, die inzwischen für eine Lebensverkürzung eindeutig bekannt sind.

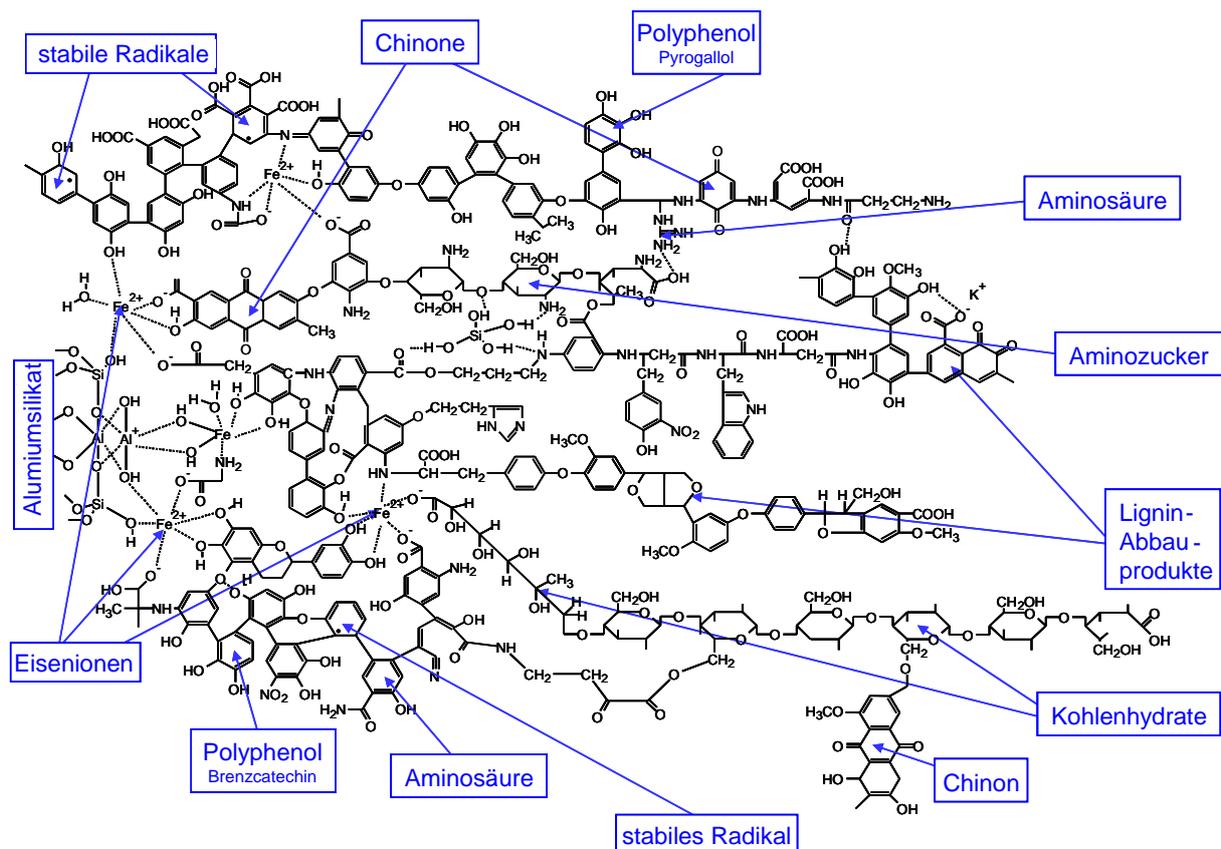


Abb. 3: Strukturvorschlag für einen Bodenhuminstoff von KLEINHEMPEL (1970), der die verschiedenen Bausteine deutlich hervorhebt. Für die Stresswirkung in aquatischen Tieren sind im Wesentlichen Polyphenole, Chinone und stabile Radikale verantwortlich, während Aminosäuren, Aminosucker und Kohlenhydrate den entgegen gesetzten Effekt hervorrufen.

Die getroffene Aussagen hinsichtlich der Lebensverlängerung und dem Erwerb von multiplen Resistenzen lassen sich durch weitere Analogieschlüsse erhärten. So zeigte die Genexpressionsanalyse bei *C. elegans* ferner, dass auch Gene aktiviert wurden, die speziell für Lebensverlängerung kodieren. Dabei handelt es sich unter anderem um solche, die für sogenannte Stressproteine, speziell die kleinen, kristallinen und das häufige HSP70 kodieren. Auch auf der Proteinseite wurden stets verschiedene HSP in allen bisher analysierten Tieren gefunden: bei Fischen und einer Reihe sehr verschiedener Flohkrebse von der Nordhemisphäre und aus dem Baikalsee. Wasserflöhe werden gerade für diese Arbeiten vorbereitet. Dies zeigt, dass sowohl der Erwerb von multipler Stressresistenz als auch das verzögerte Altern mit der Fähigkeit verbunden sind, diese Stressproteine zu exprimieren. Zur mechanistischen Bestätigung dieser Aussage kann beispielsweise eine Studie an der schwarzbäuchigen Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* herangezogen werden. In dieser Untersuchung wurden ein Wildstamm und eine Mutante hinsichtlich ihrer Lebenszeit verglichen. Die Mutante war nicht in der Lage, kristalline Stressproteine zu exprimieren und hatte nur rund 2/3 der Lebenserwartung wie der Wildstamm. Wahrscheinlich war sie auch gegenüber Stressoren weniger resistent als letzterer.

Der Wurm ist kein Einzelfall: heimische und tropische Wasserflöhe

Inspiziert durch die Studien am Fadenwurm *C. elegans*, haben wir vergleichbare Lebensspannenstudien auf andere, relativ kurzlebige Tiere ausgedehnt. Als erster Kandidat wurde der heimische Große Wasserfloh, *Daphnia magna*, dieser Prozedur unterzogen. Diese Wasserflohart kommt bevorzugt in kleinen Gewässern vor und hat sich als Modellart in den ökotoxikologischen Testbatterien seit langem etabliert. Unter optimalen Bedingungen bestehen die Populationen nur aus Weibchen und diese vermehren sich parthenogenetisch, also über so genannte Jungfernzeugung, bei der Weibchen stets Weibchen mit identischer Genausstattung produzieren. Unter Stressbedingungen werden schlagartig Männchen gebildet, die mit den Weibchen kopulieren, worauf diese befruchtete Dauereier hervorbringen. Diese sind ihrerseits diapausefähig, das heißt, sie können eine lange Zeit die schlechten Bedingungen überdauern, um dann bei verbesserten Umwelten wieder junge Weibchen zu entlassen.

Die Exposition gegenüber Huminstoffen war ein solcher Umweltstress, der die Weibchen schlagartig Männchen hervorbringen ließ. Männchen und Weibchen wurden anschließend getrennt gegenüber steigenden Huminstoffkonzentrationen exponiert – mit einem überraschenden Ergebnis: Bei den Weibchen führte jede Huminstoffkonzentration zu einer Lebensverkürzung (Abb. 4A) und sogar zu verminderter Fruchtbarkeit. Für die *D. magna*-Weibchen waren die verwendeten Huminstoffe somit eindeutig toxisch. Für die deutlich kürzer lebenden Männchen dagegen waren diese Stoffe eindeutig lebensverlängernd (Abb. 4B). 50 % der Männchen lebten bis zu 9 Tagen länger. Nach unserer Kenntnis ist dies erst der zweite Beleg, dass ein chemischer Stress bei Wirbellosen zu einer geschlechtsspezifischen Lebenszeitmodulation führt. Ökologisch macht diese scheinbare seltsame Lebenszeitmodulation durchaus Sinn. Weibliche Wasserflöhe können sich bis kurz vor dem Tod vermehren, also auch mit Männchen Dauereier produzieren. Wenn nun die Lebenszeit der Männchen verlängert wird, werden die Lebensspannen tendenziell synchronisiert und damit die Zeit zur Produktion von Dauereiern verlängert.

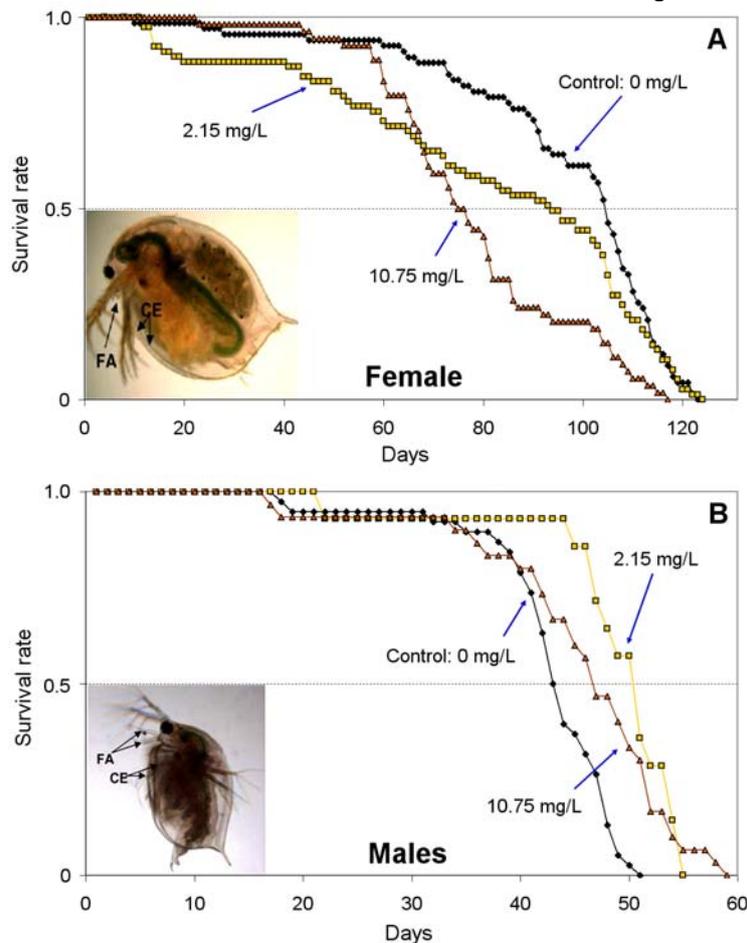


Abb. 4: Exposition des Großen Wasserfloh *Daphnia magna* gegen steigende Konzentrationen von HuminFeed als DOC, dem üblichen Maß für Huminstoffkonzentrationen. Dieser käufliche Huminstoff ist ein Bodenextrakt, reich an phenolischen Komponenten (aus EUENT *et al.* 2008). **A:** Weibchen: Lebensverkürzungen mit allen Huminstoffkonzentrationen. **B:** Männchen: Lebensverlängerung mit allen Huminstoffkonzentrationen. In beiden Grafiken sind die Unterschiede zu den Kontrollen auf dem $p < 0.01$ Niveau signifikant.

Beachte: Die Zeitskalen (X-Achsen) sind unterschiedlich. Die Unterschiede der beiden Geschlechter sind in den eingefügten Mikrofotos erkennbar. Sie unterscheiden sich in den ersten Antennen (FA), die bei den Weibchen kurz und bei den Männchen zu einem Greiforgan umgewandelt sind. Der muschelschalenähnliche Panzer der Weibchen hat zwei uniforme, symmetrische Kanten (CE), während sie bei den Männchen unsymmetrisch sind. Mikrofotos aus OLMSTEAD & LEBLANC (2007).

Wie sieht es nun bei anderen Wasserflöhen aus, beispielsweise bei der tropischen Gattung *Moina*? Viele Arten dieser Gattung spielen bekanntlich eine wichtige Rolle als Jungfischfutter in Aquaristik und Aquakultur. Für unsere Untersuchungen haben die tropischen Tiere den großen Vorteil, dass sie viel kürzer als unsere heimischen Wasserflöhe leben. So lebt *M. macrocopa* nur gut 3 Wochen, wenn sie unter identischen Bedingungen wie *D. magna* gehalten wurde; unter tropischen Temperaturen werden nur rund zwei Wochen erreicht. Der letztgenannte Große Wasserfloh brachte es dagegen auf fast 3 Monate.

Uns standen zwei *Moina*-Arten aus Brasilien zur Verfügung, nämlich *M. macrocopa* aus einer Baupfütze in Rio de Janeiro und *M. micrura* aus der Cabiúnas-Lagune, einem flachen, stark huminstoffhaltigen Gewässer im Restinga de Jurubatiba Nationalpark nahe der Erdölstadt Macaé, 180 km in östlicher Richtung von Rio de Janeiro entfernt. Einen kleinen Eindruck über diese faszinierende Küstenlagunen-Landschaft vermitteln die Fotos in Abb. 5.

Bei der anderen *Moina*-Art, *M. micrura*, handelt es sich offensichtlich um ein huminstoffliebendes Tier, denn sie weigerte sich im Labor zu wachsen, wenn die Kulturlösung keine Huminstoffe enthielt. Vielmehr steigerten Huminstoffzugaben aus der Atoleiro-Lagune (ebenfalls im Restinga de Jurubatiba Nationalpark gelegen und mit über 200 mg/L DOC unserer Kenntnis nach das huminstoffreichste Oberflächengewässer der Welt) die Vermehrungsrate bis zu einer Konzentration von 50 mg/L DOC. Selbst diese Konzentration überschreitet alle aus Europa bekannten Werte. Erst 100 mg/L DOC aus der Atoleiro-Lagune hatten eine hemmende Wirkung. Unsere Arbeitshypothese, die in einer laufenden Dissertation in Rio de Janeiro überprüft wird, lautet, dass neben dieser hormonähnlichen Wirkung auch diese Wasserflöhe in den polyhumosen Küstenlagunen eine multiple Stressresistenz entwickelt haben. Denn besonders die Organismen in diesen Lagunen sollten gegenüber Salz und den damit verbundenen osmotischen Stresssituationen resistent geworden sein, weil der Atlantische Ozean bei Stürmen gelegentlich in diese Gewässer.

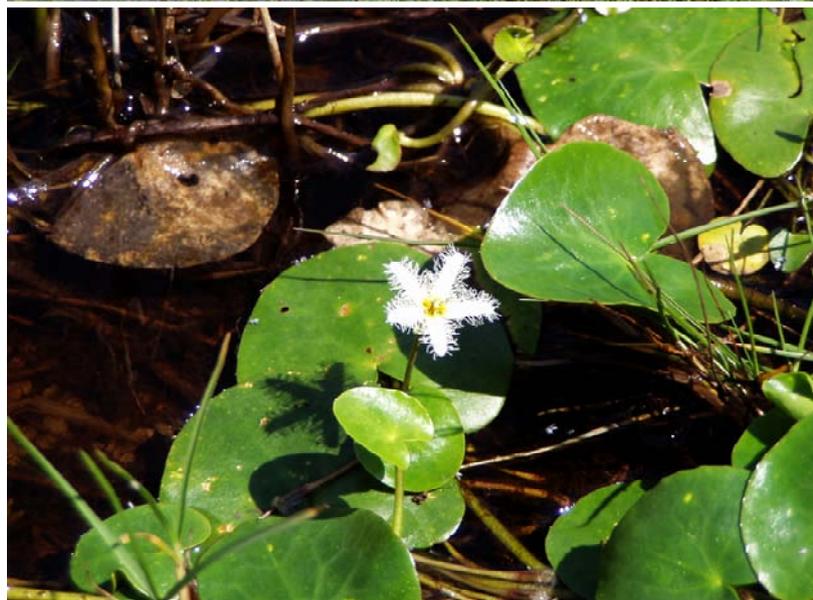
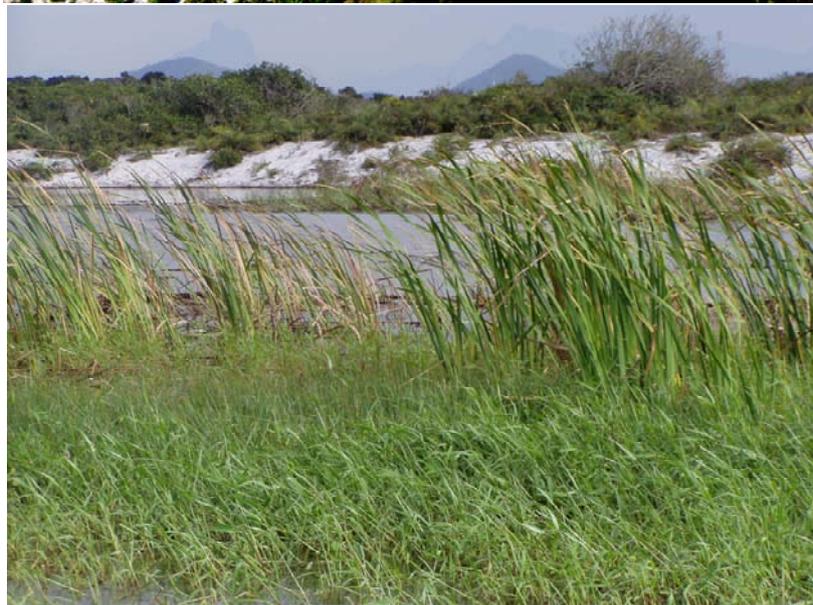


Abb. 5: Ansichten der Cabiúnas-Lagune im Restinga de Jurubatiba Nationalpark. Mit ca. 20 mg/L DOC enthält das Wasser in dieser Lagune mindestens so viele Huminstoffe wie der amazonische Rio Negro und bildet einen auffallenden Kontrast zu dem schneeweißen Sand der Sandbank (Restinga), die diese Gewässer vom Atlantik trennt. **Oben:** Luftbild der Cabiúnas-Lagune; **Mitte:** Uferansicht mit dem tropischen Rohrkolben *Typha domingensis*; **unten:** die Seekanne *Nymphoides indica* (*humboldtiana*) (Fotos. Romulo CAMPOS, Christian E.W STEINBERG).

Sind Fische nur größere Würmer?

Was ist nun über die Wirkung von Huminstoffen auf Fische oder in Fischen bekannt? Sind Fische nur etwas größere Würmer? In gewisser Hinsicht sind sie in der Tat nicht mehr als größere Würmer – auch wenn die Aquarianer dies natürlich nicht gern hören. Zu erst einmal sind sie deutlich langlebiger als unser verrückter Wurm oder die tropischen Wasserflöhe, so dass mit Huminstoffen noch keine entsprechenden Lebenszeitstudien vorliegen. Sie wären denkbar, und zwar mit dem afrikanischen Killifisch *Nothobranchius furzeri* (Abb. 6), der seinen gesamten Lebenszyklus in nur rund 12 Wochen abschließt, um die Trockenzeiten in den Savannen als befruchtetes Ei zu überdauern. Damit ist seine Lebensspanne mit der unseres Großen Wasserfloh vergleichbar.

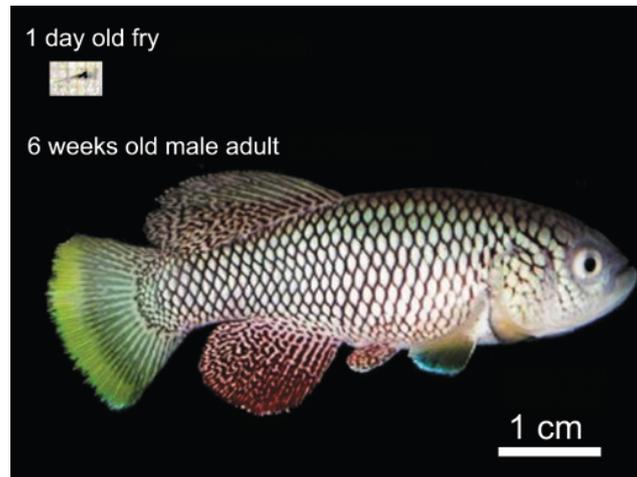


Abb. 6: Der afrikanische Killifisch *Nothobranchius furzeri* zeichnet sich durch ein beschleunigtes Wachstum aus. Im kleinen Bild ist die 1 Tag alte Brut zu sehen, während das große ein 6 Wochen altes erwachsenes Männchen zeigt (aus VALENZANO & CELLERINO 2006).

Die Alterungsforscher, immer auf der Suche nach überzeugenden Modelltieren, haben dieses schnelllebige Wirbeltier für ihre Zwecke entdeckt und auch bereits eingesetzt. Schließlich wirken *Anti-Aging*-Pillen auf den Käufer anziehender, wenn auf der Packung steht „Erfolgreich mit dem Wirbeltier XYZ getestet“ anstelle von „Hat dem Wurm ABC das Leben verlängert“. Und siehe da: auch das Wirbeltier mit dem für deutsche Ohren seltsamen Artnamen zeigt sich von Bausteinen der Huminstoffe sehr positiv beeindruckt. So testete eine italienische Arbeitsgruppe erfolgreich das Polyphenol Resveratrol, das in vielen Früchten und im Olivenöl vorkommt: Der Fisch lebte 2 Wochen länger. Das bedeutet, dass wir mit einiger Berechtigung davon ausgehen dürfen, dass viele der oben am Wurm und den Wasserflöhen beschriebenen Mechanismen, beispielsweise der Erwerb von multiplen Stressresistenzen, so oder ähnlich auch für Fische gelten werden.

Multiple Stressresistenz bei Fischen

Wie ausgeführt, liegen vergleichbare, detaillierte und auf die Mechanismen abzielende Lebenszyklusstudien mit Fischen noch nicht vor. Gleichwohl lassen sich mit der heutigen Kenntnis auch unsere älteren Studien an Fischen besser interpretieren. In einer zeitaufwändigen Untersuchung am Schwerträger, *Xiphophorus helleri*, stellten wir die Herausbildung einer offensichtlichen (multiplen) Resistenz fest, und zwar gegenüber mechanischen Triggern (Abb. 7). Über zwei Wochen wurden die jungen Fische täglich mit Keschern aus den Aquarien herausgefangen und in neues Wasser umgesetzt (als *two weeks handling stress* in der Abbildung bezeichnet). Die anschließende Gewichtsentwicklung bei den Tieren in den Kontrollen stagnierte nahezu, während sich die Tiere selbst in der niedrigsten Huminstoffkonzentration nach dem Stress sofort wieder erholten und so weiter wuchsen, als hätte es diesen existenziellen Stress nicht gegeben. Dies lässt sich nur damit erklären, dass die jungen Schwerträger, durch die über die Huminstoffe vermittelten chemischen Reize, eine Resistenz auch gegen physikalische Stressoren entwickelt haben, also eine multiple Stressresistenz entwickelt hatten.

Eine weitere Untersuchung mit biochemischen Stressparametern, wie Cortisolkonzentrationen, hat jüngst ferner gezeigt, dass Karpfen thermischen Stress besser verkraften, wenn Huminstoffe im Wasser vorhanden waren. Allerdings konnte die Autorin diese stressmindernde Wirkung nicht bei allen Huminstoffen feststellen. Bei dem stressmindernden Effekt wissen wir

noch nicht mit letzter Sicherheit, ob es dieselben Wirkstrukturen wie bei der Lebensverlängerung sind.

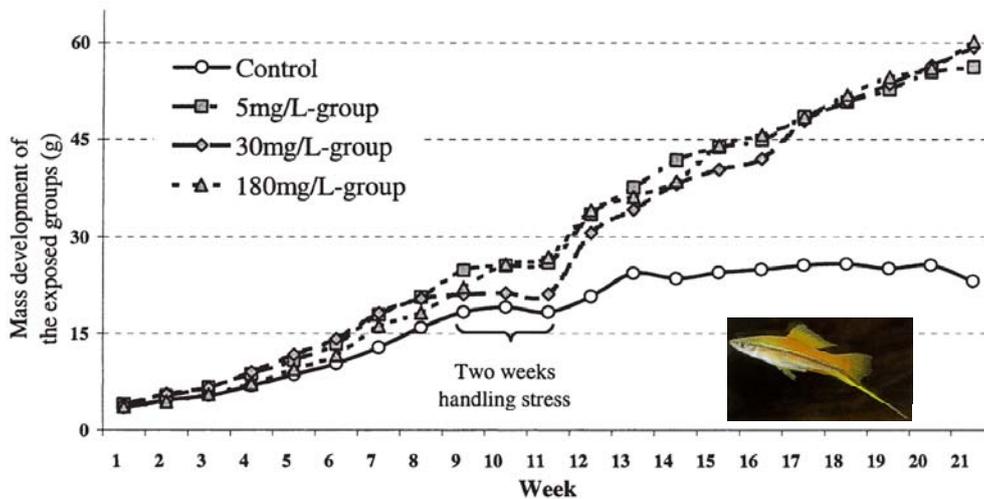


Abb. 7: Gewichtsentwicklung von Embryonen und Jungfischen des Schwerträgers, *Xiphophorus helleri*, die gegenüber steigenden Konzentrationen des synthetischen HS1500 exponiert worden waren. Wir haben dieses Huminstoffpräparat aus zwei Gründen angewandt: 1. konnte jegliche Kontamination mit Xenobiotika ausgeschlossen werden und 2. lagen mit diesem Präparat vergleichsweise viele andere Untersuchungsergebnisse vor (aus MEINELT *et al.* 2004). Von der 9. bis 11. Woche wurden die jungen Fische durch tägliches Käschern sehr stark unter Stress gesetzt. Von diesem Stress erholten sich die Tiere, die keine Huminstoffe in ihrem Aquarium hatten, nicht mehr.

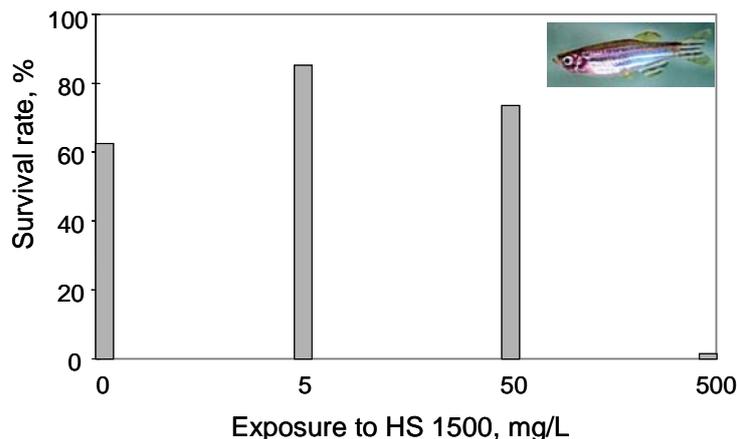


Abb. 8: Modulation der Überlebensrate von Zebrafisch (*Danio rerio*)-Embryonen, wenn sie gegenüber dem synthetischen Huminstoff HS1500 exponiert wurden (MEINELT, STÜBER, STEINBERG unveröffentlicht). Es zeichnet sich die Tendenz ab, dass wiederum niedrige Konzentrationen einen fördernden Effekt ausüben, während hohe Konzentrationen eindeutig toxisch wirken.

Auch auf die individuelle Entwicklung von Fischen haben Huminstoffe eine positive Wirkung. Wir haben dies mit befruchteten Eiern des Zebrafischarbblings getestet. Bedingt durch die ohnehin große Variabilität beim Überleben der auf sich gestellten Eier der r-Strategen ergeben sich keine statistisch abgesicherten Ergebnisse; gleichwohl zeichnet sich als Tendenz ab, dass wiederum niedrige Konzentrationen einen fördernden Effekt ausüben, während hohe Konzentrationen eindeutig toxisch wirken (Abb. 8). Toxische bis reproduktionstoxische Wirkungen von Huminstoffpräparaten wurden auch mit Embryonen des Zebrafischarbblings sowie in australischen Flüssen beobachtet, wenn hohe Konzentrationen von *Eucalyptus*-Auslaugungen vorzufinden waren.

Gleichsam als Freiland-Bestätigung der obigen Ergebnisse mit dem Zebrafischarbbling können die Ergebnisse aus Seen des kanadischen Schildes gewertet werden. Diese Autoren fanden an Seen des kanadischen Schildes, dass der Schlupferfolg und das Aufkommen des Gelbbarsches *Perca flavescens* besonders gut war, wenn die Huminstoffkonzentrationen in Folge von Abholzaktionen im Einzugsgebiet besonders hoch waren.

Fischleben im Schwarzwasser erst durch Huminstoffe möglich

Eine ökophysiologische und evolutionsbiologische Frage, die Wissenschaftler bewegt, ist: Wie bewerkstelligen es die Fische, in sauren und mineralienarmen Gewässern, wie dem Rio Negro,

den Lagunen im Restinga de Jurubatiba Nationalpark oder den Habitaten vieler Labyrinthfische in Südost-Asien, zu existieren (Abb. 9)? Wie konzentrieren sie die wenigen basischen Ionen aus dem Wasser auf und verhindern anschließend die Abgabe aus ihren Körpern? Bei einem pH-Wert um 3 bis 4 sollten sich Knochen auflösen und nicht bilden können, wie man aus der Forschung über Gewässerversauerung durch saure Depositionen oder durch Bergbau weiß.



Abb. 9: Der erste Fischzug in der Atoleiro-Lagune im Restinga de Jurubatiba Nationalpark. In dieser Lagune war zuvor nicht bekannt, ob überhaupt Fische vorkommen. Ein pH-Wert um 3.0 und niedriger Ionengehalt machten dies fraglich, da es unwahrscheinlich war, dass Knochen aufgebaut werden können. Bei diesem Fischzug wurden aber Prachtexemplare von *Hyphessobrycon*- und *Poecilia*-Arten gefunden - Huminstoffe im Wasser machen das Fischleben möglich (Fotos C.E.W. STEINBERG).

Eine aufschlussreiche Untersuchung zu diesem Thema wurde gerade von einer brasilianischen Arbeitsgruppe veröffentlicht. Diese kommt zu dem Schluss, dass Huminstoffe sowohl die Aufnahme der Ionen verbessern als auch deren Abgabe aus den Fischen vermindern. Diese Prozesse scheinen für Na- und Ca-Ionen unterschiedlich gewichtet zu sein. So wurde für Ca eine deutlich verstärkte Aufnahme gefunden, wenn Huminstoffe in der Lösung waren. Ob der pH-Wert um 3,0 oder um den Neutralpunkt lag, spielte eine sehr untergeordnete Rolle. Ferner schien beim Roten Neons (*Paracheirodon axelrodi*) im Falle des Na der Export stärker gehemmt zu sein als beim Ca, sodass bei dieser Fischart die Selbstregulation beim Na durch gehemmten Export und bei Ca durch gesteigertem Import sicher gestellt war. Für die verstärkte Aufnahme der lebenswichtigen basischen Kationen wurde in diesen Arbeiten folgender Mechanismus diskutiert: Huminstoffaggregate mit den basischen Kationen schlagen sich auf den Kiemen nieder und konzentrieren auf diese Weise die Kationen auf. Die Aufnahme durch die Kiemen geschieht nun nicht mehr gegen so starke Gradienten, als wenn die Kationen in reiner Lösung vorliegen. Doch wie wird das Ausbluten der Kationen vermindert oder behindert? Die diskutierten Mechanismen scheinen weder für die Aufnahme noch für die reduzierte Abgabe vollständig zu überzeugen. Es muss mit Sicherheit noch weitere Mechanismen geben. Hinweise hierauf vermittelt wiederum unser „verrückter Wurm“ über Analogieschlüsse.

Über eine gesamtgenomische Analyse mit *C. elegans*, den wir gegen zwei verschiedene Huminstoffe exponierten, stellte sich heraus, dass zumindest bei diesem Tier noch weitere Aufnahmemechanismen vorhanden sind. So wurden Gene aktiviert, die für so genannte Ionenkanäle kodieren. Letztere sind Proteine in den Membranen, die anorganische Ionen (wie Na- und Ca-Ionen) in das Zellinnere hineinpumpen. Ferner wurden bei dem Fadenwurm auch Gene aktiviert, die für die Aufnahme von organischen Ionen kodieren. Diese *organic acid carrier* sind recht unspezifisch, sodass wir uns gut vorstellen können, dass auch kleinere Komplexe von Huminstoffen mit basischen Kationen durch diese Pumpen aufgenommen werden können. Kürzlich fanden wir an Flohkrebse darüber hinaus am Beispiel dass Huminstoffe auch weitere so genannte Exporter blockieren können. Diese Exporter sind membranständige Proteine, die verschiedene Abbauprodukte, aber auch Fremdstoffe aus den Zellen pumpen, damit sie dort keine schädliche Wirkung entfalten. Eine Blockade der Exporter bedeutet nun, dass einmal aufgenommene Stoffe in den Zellen bleiben. Wir sind sicher, dass dieser Befund auch für solche Exporter gilt, die an der Regulation anorganischer Ionen (so genannte Ionenkanäle) beteiligt sind, somit einmal aufgenommene lebenswichtige Metallionen in den Zellen verbleiben, wenn die Organismen in gelösten Huminstoffen schwimmen.

Was Huminstoffe an Fischen sonst noch verursachen

Auf der Suche nach wirksamen Alternativen zu den starken chemischen Therapeutika in der

Aquakultur, die sehr viele Nebenwirkungen hervorrufen, wurden natürliche und künstlich hergestellte Huminstoffe schon oft getestet. Von daher ist schon seit geraumer Zeit bekannt, dass Huminstoffe auf Fische zahlreiche direkte und indirekte Wirkungen ausüben. Wie in rein anwendungsorientierter Forschung üblich, bleiben viele Beobachtungen auf der phänomenologischen Ebene stehen und sind zudem häufig in schwer zugänglichen Veröffentlichungen, wie internen Berichten von Forschungseinrichtungen, publiziert worden. Gleichwohl erscheinen sie inzwischen im Lichte der oben geschilderten mechanistischen Studien mit dem Nematoden *C. elegans* als glaubwürdig und verdienen es, hier zugänglich gemacht zu werden.

Bekannt war, dass Huminstoffe über eine Aktivierung von weißen Blutzellen das Immunsystem stärken und zu weiteren zellulären Abwehrmechanismen führen. Ferner gerben sie Haut oder leiten eine Neubildung von Membranen durch die Ausfällung von Proteinen ein. Solche Membranen sind auf Schleimhäuten und besonders auf Wunden zu finden und bewirken entzündungshemmende, entwässernde und/oder Blut stillende Effekte. Es lässt sich leicht vorstellen, dass Fische mit einer gegerbten Haut widerstandsfähiger sind gegen die Eindringung und das Wachstum der überall vorkommenden parasitären Pilze.

Bevor man herausfand und dann zögernd akzeptierte, dass Huminstoff aufgenommen werden können und vielfältige interne Reaktionen in den Organismen hervorrufen können, führte man die beobachteten positiven Effekt von Huminstoffexposition in Aquaristik und Aquakultur neben dem schon erwähnten Stärkungseffekten (vgl. Abb. 7) überwiegend auf indirekte Wirkungen zurück. Die wichtigsten indirekten Wirkungen betreffen die Interaktionen von Pathogenen und Parasiten mit Fischen.

Pathogene und Parasiten sind überall. In Freiland ist ein gesunder Fisch durch eine große Diversität an Parasiten gekennzeichnet, die allerdings nur in geringen Individuendichten auftreten. Bei ungünstigen Umweltbedingungen vermindert sich die Diversität der Parasiten, dafür nimmt die Individuendichte drastisch zu. Ferner können Stresssituationen, die auf die Fische wirken, das Gleichgewicht zwischen Wirten und Parasiten zu Gunsten der Parasiten verschieben.

Pathogene Bakterien und Protozoen. Es gibt nur wenige und zudem untereinander nicht widerspruchsfreie Berichte darüber, ob Huminstoffe die Entwicklung von pathogenen Bakterien und Protozoen behindern können. Ein denkbarer Mechanismus für die Hemmung von Bakterien und Protozoen ist die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies aus belichteten Huminstoffen. Im Allgemeinen sind die Einzeller deutlich empfindlicher als die Fische. Ein ähnlicher Mechanismus kann auch für eingedrungene Pathogene Gültigkeit haben. Denn sowohl die eingedrungenen Pathogene als auch die aufgenommenen Huminstoffe führen zu einer internen Aktivierung von Sauerstoff. Es entsteht der so genannte oxidative Stress, der die Pathogene stärker als den Wirt schädigt.

Parasiten. Geschwächte Wirtstiere werden bevorzugt von Parasiten heimgesucht. Auch zu der Wirkung von Huminstoffen auf die unliebsamen Gäste widersprechen sich die wenigen vorliegenden Berichte, möglicherweise deshalb, weil mit unterschiedlichen Huminstoffen exponiert wurde. Die Berichte charakterisieren die verwendeten Huminstoffe leider nicht ausreichend umfangreich, um dies beurteilen zu können.

Um diesem Mangel abzuhelpen, wurden in jüngster Zeit wurden zwei recht umfangreiche Studien über die Wirkung von Huminstoffen auf die Infektion von Goldfischen mit dem Wasserschimmel, *Saprolegnia parasitica*, sowie sein Myzelwachstum durchgeführt. Die Goldfische wurden in Hälterungsbecken 1,5 bis 2 Stunden pro Tag mit einer Huminstofflösung (HS1500) behandelt. In der Kontrollgruppe starben 16 %, in der behandelten nur 8 % der Tiere. In den behandelten Tieren verschwanden die Sekundärinfektionen mit *Saprolegnia parasitica* und Läsionen sowie Entzündungen heilten rasch ab (Abb. 10).

In der zweiten, oben schon erwähnten Studie wurden 20 sehr unterschiedliche Huminstoffe in ihrer Wirkung auf das Myzelwachstum getestet. Mit wenigen Ausnahmen verminderten die Huminstoffe in umweltrealistischen Konzentrationen das vegetative Wachstum dieses Pilzes. Allerdings wurde die Ausbildung von Zoosporen nicht behindert. Die Pilze gehen in ein Dauerstadium über, das schlechte Umweltbedingungen überdauern kann. Für den hemmenden Effekt scheinen besonders die gealterten Huminstoffe mit höherer Aromatizität verantwortlich zu sein, wohingegen leicht verwertbare Strukturen, wie Aminosäuren und Kohlenhydrate das vegetative Wachstum eher fördern. Insgesamt können Huminstoffe das Wachstum und die Virulenz von *S. parasitica* nicht ganz unterbinden, scheinen aber eine Infektion deutlich zu lindern und eine Heilung zu beschleunigen.



Abb. 10, A: Goldfisch einer unbehandelten Kontrolle. Nekrose der Rücken- und Schwanzflosse, verbunden mit einer sekundären *Saprolegnia*-Infektion (oben, links und rechts). Läsionen an Kiemen und Haut, verbunden mit einer blutunterlaufenen, sekundären *Saprolegnia*-Infektion (unten links und rechts); **B:** Goldfisch aus der mit Huminstoffen (HS1500) behandelten Gruppe. Heilung der Rücken- und Schwanzflosse abgeschlossen (oben links und rechts). Entzündung von Kiemen und Haut fast abgeklungen (unten links und rechts, nach HEIDRICH 2005, aus MEINELT *et al.* 2008)

Was folgt für den Aquarianer oder die Aquarianerin?

Für die Haltung und Zucht von empfindlichen Schwarzwasserfischen heißen diese Ausführungen über die Qualität der Huminstoffe: Solange nicht für die einzelnen Wirkungen von Huminstoffen bestimmte Strukturelemente namhaft gemacht werden können, sollte man nicht mit bestimmten neuen Huminstoffqualitäten experimentieren, sondern die durch langjährige Empirie gewonnenen Rezepte weiterhin anwenden. Diese Situation wird sich auch nicht sehr rasch ändern, da Huminstoffe so genannte Geopolymere sind. Das heißt, ihre konkrete Zusammensetzung ändert sich von Ort zu Ort und – selbst an ein und demselben Ort – mit der Jahreszeit. Um Effekte auf bestimmte Qualitäten zurückführen zu können, benötigt man eine große Zahl an Experimenten mit verschiedenen Huminstoffisolaten, damit sich eine Struktur-Wirkungs-Beziehung durchführen lässt.

Nicht empfehlenswert sind Nadel- oder Eukalyptus-Streu, von denen eine hemmende bis toxische Wirkung bekannt ist. (Die Warnung vor Eukalyptus-Streu mag erst einmal exotisch klingen. Gleichwohl befindet sich diese Baumgattung in der Waldwirtschaft weltweit und insbesondere auch in Südeuropa auf dem Vormarsch, nachdem sie schon viele tropische Länder erobert hatte.) Auch könnten frische Blätter oder frisches Falllaub wegen ihrer Gehalte an gut verfügbaren Proteinen und Kohlenhydrate problematisch für die Wasserbewohner werden. Somit bleibt als Empfehlung nur, etwas gealtertes Falllaub vom Boden oder Erlenzäpfchen zu verwenden. Nach unseren Erfahrungen sind diese Stoffe arm an bioverfügbaren Proteinen und Kohlenhydraten deutlich reaktiver als ganz frische.

Eine weitere Gefahr besteht u. U. in einer Überdosierung der Huminstoffe. Wir haben an verschiedenen Beispielen aufgezeigt, dass insbesondere die niedrigen und mittleren Konzentrationen positive Effekte wie Lebensverlängerung oder Stressresistenz hervorrufen. Hohe Konzentrationen wirken dagegen oft toxisch oder gar reproduktionstoxisch. Daraus folgt, dass Huminstoffe nicht überdosiert werden dürfen, damit es den Fischen nachhaltig gut ergeht. Doch besteht die Gefahr einer Überdosierung in Aquarien tatsächlich? Bei Konzentrationen, die unseren Versuchen negative bis toxische Effekte hervorriefen, sind so hoch, dass sie die Sicht auf die Fische im Aquarium vollständig rauben würden. Diesen Zustand wird ein aufmerksamer Aquarianer sicherlich nicht anstreben.

Danksagung

Jayme SANTANGELO und Albert SUHETT von der Universidade Federal do Rio de Janeiro gilt unser Dank für den genehmigten Import der beiden *Moina*-Arten. Ein ganz besonderer Dank gebührt unseren Studierenden Albert, Andreas, Laura und Ramona, die unermüdlich die Nematoden und Wasserflöhe zählten und die Kulturen mit viel Liebe und Engagement am Leben hielten.

Benutzte und weiterführende Literatur

- BERTOLO, A., MAGNAN, P. (2007): Logging-induced variations in dissolved organic carbon affect yellow perch (*Perca flavescens*) recruitment in Canadian Shield lakes. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* **64**: 181–186.
 BIJLSMA, R., LOESCHKE, V. (eds., 1997): *Environmental Stress, Adaptation and Evolution*. Birkhäuser-Verlag, Basel.
 BITTNER, M., JANOŠEK, J., HILSCHEHOVÁ, K., GIESY, J., HOLOUBEK, I., BLÁHA, L. (2006): Activation of Ah receptor by pure humic acids. *Environmental Toxicology* **21**, 338–342
 CALABRESE, E.J., BALDWIN, K.A. (2003): Toxicology rethinks its central belief – Hormesis demands a reappraisal of the way risks

- are assessed. *Nature* **421**, 691–692.
- CAZENAIVE, J., ÁNGELES BISTONI, M. DE, ZWIRNMANN, E., WUNDERLIN, D.A., WIEGAND, C. (2006): Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (*Danio rerio*) embryos – Benefits and costs of microcystin detoxication. *Environmental Toxicology* **21**, 22–32.
- GEMS, D., MCELWEE, J.J. (2003): Microarraying mortality. *Nature* **424**, 259–261.
- HEIDRICH, S. (2005): Prophylaktischer und therapeutischer Einsatz von Braunkohle-Huminstoffen in der Nutz- und Zierfischzucht. *Inaugural-Dissertation an der Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig*.
- HÖSS, S., BERGTOLD, M., HAITZER, M., TRAUNSPURGER, W., STEINBERG, C.E.W. (2001): Refractory dissolved organic matter can influence the reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). *Freshwater Biology* **46**, 1–10.
- JANOŠEK, J., BITTNER, M., HILSCHEROVÁ, K., BLÁHA, L., GIESY, J.P., HOLOUBEK, I. (2007): AhR-mediated and antiestrogenic activity of humic substances. *Chemosphere* **67**, 1096–1101.
- KLEINHEMPEL, D. (1970): Ein Beitrag zur Theorie des Huminstoffzustandes. *Albrecht-Thaer-Archiv* **14**, 3–14.
- KOZLOWSKY-SUZUKI, B., BOZELLI, R.L. (2004): Resilience of a zooplankton community subjected to marine intrusion in a tropical coastal lagoon. *Hydrobiologia* **522**, 165–177.
- LUTZ, I., ZHANG, J., OPITZ, R., KLOAS, W., XU, Y., MENZEL, R., STEINBERG, C.E.W. (2005): Environmental signals: Synthetic humic substances act as xeno-estrogen and affect the thyroid system of *Xenopus laevis*. *Chemosphere* **61**, 1183–1188.
- MCMMASTER, D., BOND, N. (2008): A field and experimental study on the tolerances of fish to *Eucalyptus camaldulensis* leachate and low dissolved oxygen concentrations. *Marine & Freshwater Research* **59**:177–185.
- MATSUO, A.Y.O., WOODIN, B.R., REDDY, C.M., VAL, A.L., STEGEMAN, J.J. (2006): Humic substances and crude oil induce cytochrome P450 1A expression in the Amazonian fish species *Colossoma macropomum* (tambaqui). *Environmental Science & Technology* **40**, 2851–2858.
- MATSUO, A.Y.O., VAL, A.L. (2007): Acclimation to humic substances prevents whole body sodium loss and stimulates branchial calcium uptake capacity in cardinal tetras *Paracheirodon axelrodi* (Schultz) subjected to extremely low pH. *Journal of Fish Biology* **70**, 989–1000.
- MEEMS, N., STEINBERG, C.E.W., WIEGAND C. (2004): Direct and interacting toxicological effects on the waterflea (*Daphnia magna*) by natural organic matter, synthetic humic substances and cypermethrin. *Science of Total Environment* **319**, 123–136.
- MEINELT, T., PAUL, A., PHAN, T.M., ZWIRNMANN, E., KRÜGER, A., WIENKE, A., STEINBERG, C.E.W. (2007): Reduction in vegetative growth of the water mold *Saprolegnia parasitica* (Coker) by humic substances of different origin. *Aquatic Toxicology* **83**, 93–103.
- MEINELT, T., SCHRECKENBACH, K., PIETROCK, M., HEIDRICH, S., STEINBERG, C.E.W. (2008): Humic Substances. Part 1: Dissolved humic substances (HS) in aquaculture and ornamental fish breeding. *Environmental Science & Pollution Research* **15**, 17–22.
- MENZEL, R., STÜRZENBAUM, S., KULAS, J., BÄRENWALDT, A., STEINBERG, C.E.W. (2005): Humic material induces behavioral and global transcriptional responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science & Technology* **39**, 8324–8332.
- MINOIS, N. (2002): Longevity and aging: Beneficial effects of exposure to mild stress. *Biogerontology* **1**, 15–29.
- MORROW, G., BATTISTINI, S., ZHANG, P., TANGUAY, R.M. (2004): Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 43382–43385.
- MURPHY, C.T., MCCARROLL, S.A., BARGMANN, C.I., FRASER, A., KAMATH, R.S., AHRINGER, J., LI, H., KENYON, C. (2003): Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**, 277–284.
- OLMSTEAD AW, LEBLANC GA. (2007): The environmental-endocrine basis of gynandromorphism (intersex) in a crustacean. *International Journal of Biological Science* **3**, 77–84.
- PAUL, A. HACKBARTH, S., VOGT, R.D., RÖDER, B., BURNISON, B.K, STEINBERG, C.E.W. (2004): Photogeneration of singlet oxygen by humic substances: comparison of humic substances of aquatic and terrestrial origin. *Photochemical & Photobiological Science* **3**, 273–280.
- REEMTSMA, T., THESE A. (2003) On-line coupling of size exclusion chromatography with electrospray ionisation-tandem mass spectrometry for the analysis of aquatic fulvic and humic acids. *Analytical Chemistry* **75**, 1500–1507.
- REEMTSMA, T., THESE, A. (2005): Comparative investigation of low-molecular-weight fulvic acids of different origin by SEC-Q-TOF-MS: New insights into structure and formation. *Environmental Science & Technology* **39**, 3507–3512.
- SAUL, N., PIETSCH, K., MENZEL, R., STEINBERG, C.E.W. (2008): Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: Is DAF-16 involved? *Mechanisms of Ageing and Development* **129**, 611–613.
- STEINBERG, C.E.W. (2003): *Ecology of humic substances in freshwaters. Determinants from geochemistry to ecological niches*. Springer-Verlag, Berlin, 440 Seiten
- STEINBERG, C., LENHART, B. (1985): *Wenn Gewässer sauer werden: Ursachen, Verlauf, Ausmaß*. BLV Verlagsgesellschaft, München, 127 Seiten.
- STEINBERG, C.E.W., HÖSS, S., KLOAS, W., LUTZ, I. MEINELT, T. PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C. (2004): Hormone-like effects of humic substances on fish, amphibians, and invertebrates. *Environmental Toxicology* **19**, 409–411.
- STEINBERG, C.E.W., KAMARA, S., PROKHOTSKAYA, V.YU., MANUSADŽIANAS, L., KARASYOVA, T., TIMOFEYEV, M.A., ZHANG, J., PAUL, A., MEINELT, T., FARJALLA, V.F., MATSUO, A.Y.O., BURNISON, B.K., MENZEL, R. (2006): Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshwater Biology* **51**, 1189–1210.
- STEINBERG, C.E.W., MEINELT, T., TIMOFEYEV, M.A., BITTNER, M, MENZEL, R. (2008): Humic substances, Part 2: Interactions with organisms. *Environmental Science & Pollution Research* **15**, 128–135.
- STEINBERG, C.E.W., PAUL, A., PFLUGMACHER, S., MEINELT, T., KLÖCKING, R., WIEGAND, C. (2003): Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals – a review. *Fresenius Environmental Bulletin* **15**, 391–401.
- STEINBERG, C.E.W., SAUL, N., PIETSCH, K., MEINELT, T., RIENAU, S., MENZEL, R. (2007): Dissolved humic substances facilitate fish life in extreme aquatic environments and have the potential to extend lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Annals of Environmental Sciences* **1**, 81–90.
- TIMOFEYEV, M.A., WIEGAND, C., BURNISON, B.K., SHATILINA, Z.M., PFLUGMACHER, S., STEINBERG, C.E.W. (2004). Direct impact of natural organic matter (NOM) on freshwater amphipods. *Science of the Total Environment* **319**, 115–121.
- TIMOFEYEV, M.A., SHATILINA, Z.M., BEDULINA, D.S., MENZEL, R., STEINBERG, C.E.W. (2007): Natural organic matter (NOM) has the potential to modify the multixenobiotic resistance (MXR) activity in freshwater amphipods *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb) and *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerst.). *Comparative Biochemistry & Physiology B* **146**, 496–503.
- TIMOFEYEV, M.A., SHATILINA, Z.M., KOLESNICHENKO, A.V., KOLESNICHENKO, V.V., STEINBERG, C.E.W. (2006) Specific antioxidant reactions to oxidative stress promoted by natural organic matter (NOM) in two amphipod species from Lake Baikal. *Environmental Toxicology* **21**, 104–110.
- VALENZANO, D.R., CELLERINO, A. (2006): Resveratrol and the pharmacology of aging: a new vertebrate model to validate an old

molecule. *Cell Cycle* **5**, 1027–1032.

WEISHEIT, C. (2006): Konditionierung von Karpfen (*Cyprinus carpio*) durch Huminstoffe verschiedener Herkunft. *Master-Arbeit im Studiengang Fishery Science and Aquaculture, Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät.*