

Abschlussbericht*

Zuwendungsempfänger:	Technische Universität Dresden	Förderkennzeichen: 2816ERA01W
Vorhabenbezeichnung:	Weiterentwickelte Biotechnologie für intensive Süßwasser-Aquakultur in geschlossenen Wasserkreislaufsystemen ABAWARE Advanced Biotechnology for Intensive-Freshwater Aquaculture Wastewater Reuse	
Laufzeit des Vorhabens:	01.05.2017 – 30.04.2019	
Berichtszeitraum:	01.05.2017 – 30.04.2019	

Inhalt (max. 20 Seiten; Schrifttyp Arial Größe 11, Zeilenabstand 1,5)

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des BMEL (z. B "Zukunft nachhaltig gestalten - Forschungsfelder des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft" aus dem Jahr 2014), auch zwecks Evaluierung von Förderprogrammen.

Das Projekt leistet einen Beitrag zu den förderpolitischen Ziel 2.3 des BMEL: Tier Gesundheit, Tierschutz und nachhaltig gestaltete Erzeugung tierischer Produkte. Hier geht es im Wesentlichen um die Weiterentwicklung gesunder Nutztierbestände und deren züchterische Weiterentwicklung. Denn diese sind eine wesentliche Voraussetzung für eine nachhaltige und wettbewerbsfähige Wertschöpfungskette. Insbesondere wird hier der Bereich der Aquakultur adressiert. Spezifisch adressiert wird hier die Fragestellung inwieweit mikrobielle Gemeinschaft und mögliche Antibiotika Resistenzgene genutzt werden können, um die Entwicklung der Fischgesundheit in einem Aquakultursystem beurteilen zu können. Gemäß des Leitgedankens Vorbeugen ist besser als heilen. So sollen die Ergebnisse dieses Projekts zu einer Optimierung der Aquakultur dienen sowie der Entwicklung eines neuen Prävention und Kontrollkonzeptes insbesondere auch im Bezug auf die Ausbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien in der Nahrungskette. Insbesondere steht hier auch die Minimierung des Antibiotikaeinsatzes als formuliertes Ziel des gesamten Konsortiums. Insbesondere wurde dies für eine nachhaltige Aquakulturform der sogenannten Rezirkulationssystem (RAS) untersucht.

2. Darstellung und Erläuterung zu:

- **den wissenschaftlich-technischen Ergebnissen des Vorhabens im Vergleich zu den ursprünglichen Zielen, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen mit Bezug zu den relevanten Arbeitspaketen des EU-Gesamtvorhabens. Methodik, Statistik und Diskussion der Ergebnisse sind gefordert.**
- **der Angemessenheit von Aufwand und Zeit,**
- **Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben.**
- **der wissenschaftlichen Anschlussfähigkeit für eine mögliche nächste Phase.**

Der deutsche Projektteil befasst sich mit den Arbeitspaketen vier und fünf des gesamten Projektes. Aufgrund seiner umfassenden Aufgabenstellung ist das europaweite Gesamtprojekt in fünf Arbeitspakete (*work packages*, kurz WP) unterteilt, an denen insgesamt acht Projektpartner beteiligt sind. Das vorliegende Teilprojekt trägt zu den WP4 und WP5 bei. In WP4 (Vorort-Untersuchungen und Analysen) werden Proben aus laufenden RAS untersucht, Antibiotikaresistenzen bestimmt und ein innovatives Screening System für ausgewählte Mikrobiota entwickelt. WP5 (Verbreitung der Projektergebnisse) sichert die Verbreitung und Nachhaltigkeit der Projektergebnisse.

Im Rahmen internationaler Probenahme-Kampagnen in Aquakulturen, an denen nahezu alle Projektpartner beteiligt sein werden, soll die mikrobielle Diversität und der Einfluss von der Zugabe von Antibiotika auf das Resistom mithilfe innovativer Methoden (next-generation sequencing, qPCR-micro-arrays) detailliert analysiert werden, um die Bedeutung von Aquakulturen für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt abschätzen zu können. Hierzu werden Wasser- und Filter-Proben aus den Aquakulturen erhoben. DNA-Extrakte werden hinsichtlich der Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft (16S-amplicon Sequenzierung) und der Abundanz verschiedener ARGs untersucht. Die Proben werden zur Analyse, Interpretation und zum Vergleich zwischen den Projektpartnern ausgetauscht.

WP4 besteht aus insgesamt sechs Meilensteinen (MS), von denen das IHB an den MS 4.4 (Charakterisierung von Süßwasser Mikrobiomen in Aquakulturen), 4.5 (Identifizierung und Quantifizierung von ARGs in Aquakulturen) und 4.6 (Entwicklung eines Screening Systems als einfache nicht-invasive Bestimmung von Mikrobiomen in RAS) beteiligt ist. Die zwei MS in WP5 beinhalten Öffentlichkeitsarbeit (5.1) und die Verbreitung der Gesamtergebnisse (5.2).

Für das WP 4 hat das Institut für Hydrobiologie mit den Partnern aus Finnland, Irland und Rumänien zusammengearbeitet. Zusammen mit den finnischen Partnern wurde die Anwendung einer Array Technologie zu Quantifizierung von Resistenzgenen getestet. An der Anlage in Rumänien wurde diese Analysetechnik angewendet. Die Analysetechnik selbst wurde mit chinesischen Partnern weiterentwickelt. Die Mikrobiomanalyse wurde zusammen mit den irischen Partnern durchgeführt, sowohl für die Anlage in Rumänien als auch für die Anlage in Deutschland. Für die Anlage in Deutschland wurden ausgewählte Resistenzgene analysiert, um so die Voraussetzungen für einen Array-basierten Ansatz zu testen.

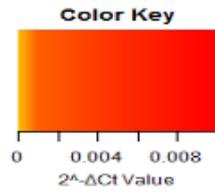
Das WP4 wurde durch den finnischen Partner Marko Virta geleitet.

Die Probenahme wurde in der Aquaterra-Anlage in Frasin, Rumänien, durchgeführt. Die Mitglieder der Laboratorien der Projektpartner führten die Probenahme gemeinsam durch und verwendeten dabei dieselben standardisierten Probenahme- und Extraktionsverfahren. Die DNA wurde aus 9 Sedimentproben und 12 Wasserproben extrahiert. Die Konzentration der extrahierten DNA wurde bestimmt.

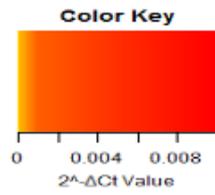
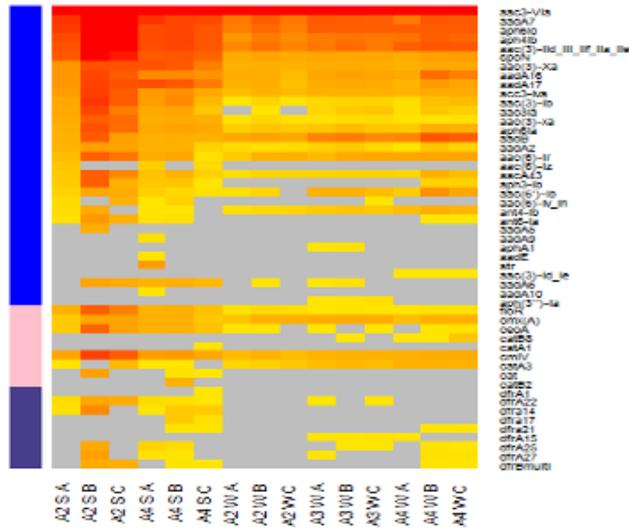
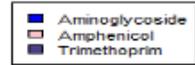
Das Primer- und Sondendesign für den qPCR-Array wurde mit Dr. Robert Stedtfeld von der Michigan State University diskutiert und finalisiert. Unser Kontaktmann an der Michigan State University, Dr. Robert Stedtfeld, stellte seine Arbeit an der Universität Anfang 2018 ein. Wir informierten den Leiter des Arbeitspakets, Prof. Marko Virta, der alternative Vorkehrungen für die Durchführung der Arbeiten im Institut für Bodenkunde der Chinesischen Akademie der Wissenschaften in Nanjing, China, traf. Dann stellten wir eine Verbindung zu den Mitarbeitern des Instituts für Bodenkunde der Chinesischen Akademie der Wissenschaften in Nanjing (China) her, wo die Proben mit einem Takara-Array-qPCR-Gerät untersucht wurden. Zusätzlich zu der vom irischen Partner extrahierten DNA haben wir Proben des rumänischen Partners und des deutschen Partners mit dieser Methode sequenziert und analysiert.

Die Ergebnisse der qPCR basieren auf der relativen Häufigkeit von 380 Resistenzen gegen Antibiotika und wurden im in Wasser und Sediment der RAS Anlage in Bulgarien analysiert. Die analysierten Proben waren Wasser (A2W) und "Sediment/Fischfutter" vom Boden des Tank (A2S), Abwasser nach dem bioaktiven Teich und vor der Filtration (A3W) und Wasser nach Filtration vor dem Eintritt in das Abflussrohr (A4W) und Sediment (A4S) aus dem Fluss 2m und 4 m stromabwärts von der Abflussleitung des Betriebs. Die folgenden Abbildungen stellen die Ergebnisse, die aus der qPCR-Analyse generiert wurden dar (FIG). Zusätzlich zu den Resistenzgenen wurden die Gene die mit genetischer Mobilität assoziiert sind in allen Proben nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass die Bakterien der RAS die genetischen Voraussetzungen besitzen, um am Gentransfer dieser ARGs zwischen und innerhalb der Bakterienspezies beteiligt zu sein.

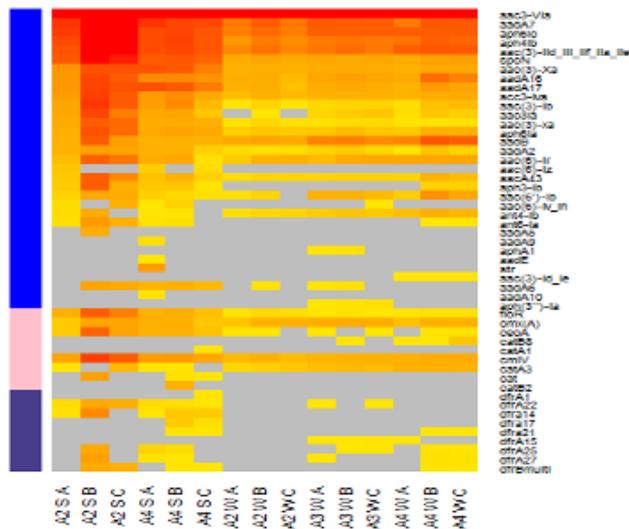
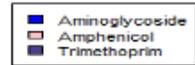
Die Abbildungen 1 (A - C) zeigen die relative Häufigkeit jedes in jeder Probe nachgewiesenen ARG. A) ARGs, die eine Resistenz gegen die Antibiotikaklassen Aminoglykoside, Amphenicole und Trimethoprim verleihen. B) ARGs, die Resistenz gegen die Beta-Laktam-, Fluorchinolon-Klassen und Multidrug-Resistenz-Gene verleihen. C) ARGs, die eine Resistenz gegen die Antibiotika-Klassen MLS, andere, Sulfonamid, Tetracyclin und Vancomycin verleihen. Grau zeigt an, dass das Gen in dieser Probe nicht vorhanden ist. Die in jedem Bild hervorgehobenen spezifischen Gene sind diejenigen mit der höchsten klinischen Bedeutung für den Menschen.



ARG Abundance



ARG Abundance



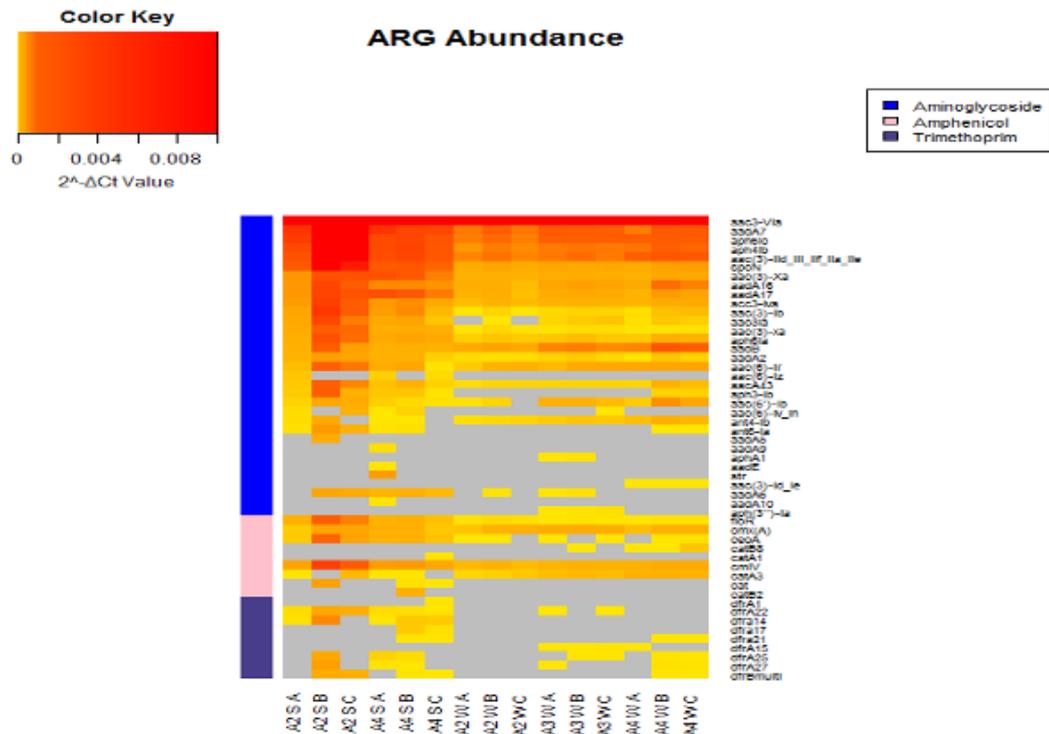


Abbildung 1 A-C, Abbildung A Aminoglykoside, Amphenicole und Trimethoprim Resistenz-Gene, Abbildung B: Beta-Laktam-, Fluorchinolon-Klassen und Multidrug-Resistenz-Gene Abbildung C: MLS, andere, Sulfonamid, Tetracyclin und Vancomycin Resistenz-Gene.

Die ARGs von klinischer Bedeutung einschließlich des ESBL, der Plasmid-vermittelten Chinolon-Resistenzgene und des mobilen Colistin-Resistenzgens wurden in allen Proben nachgewiesen. Die Bedeutung dieser Ergebnisse besteht darin, dass die Verwendung von RAS die Präsenz spezifischer ARGs innerhalb oder stromabwärts der Einrichtung nicht zu erhöhen scheint. Dies deutet darauf hin, dass sie kein signifikantes Risiko für die erhöhte Übertragung von AMR in der Umwelt darstellt. Es scheint jedoch auch nicht zu einer signifikanten Verringerung der in den Proben vorhandenen AMR-Konzentrationen zu führen. Diese Ergebnisse werden mit denen der RAS-Einrichtungen in Norwegen und Deutschland verglichen, um spezifische Trends und gemeinsame Ergebnisse zu ermitteln. Die Ergebnisse werden als kombinierte Datensätze und wissenschaftliche Publikationen veröffentlicht. Zusätzlich wurden die Mikrobiome jeder Probe mittels 16S rRNA-Amplikonsequenzierung analysiert. Die Daten wurden in MG-RAST mit allen bekannten Bakteriensequenzen verglichen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Anlage in Aquaterra ist in Abbildung 2 beschrieben.

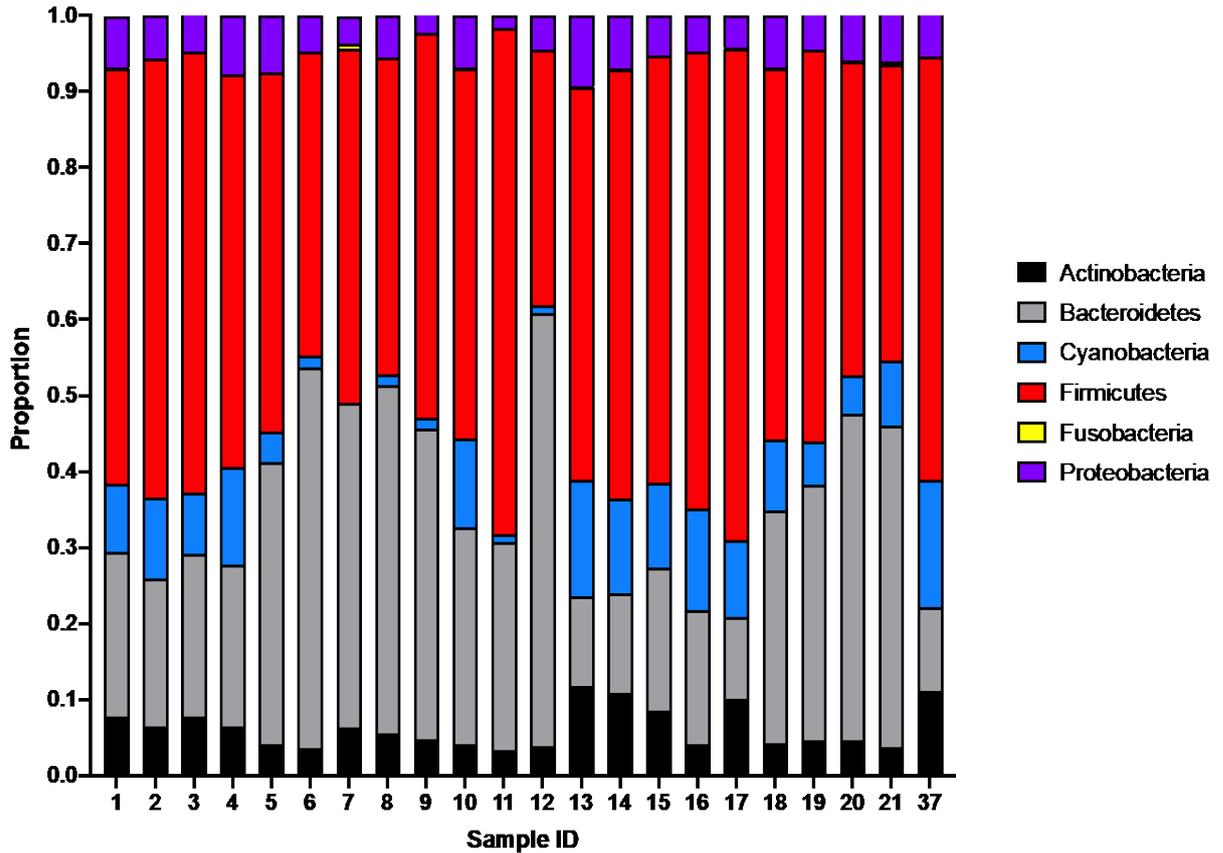


Abbildung 2: Sample ID steht für: 1 – 3 Wasser des Baches stromaufwärts, 4 – 9 Wasser des Fischbeckes, 10 – 12 Wasser des Baches Stromabwärts, Sediment des Baches stromaufwärts 13-15, Sediment des Fischbeckens 16-18. Sediment des Baches stromabwärts 19-21, 37 ist eine Probe des Filters.

Die Mikrobiomzusammensetzung der Wasserproben stromaufwärts der RAS (ID 1 - 3) enthielt eine größere Anzahl von Cyanobakterien als im Fischbecken (4 - 9) oder stromabwärts (10 - 12). Diese Phyla variierten auch über die Sedimentproben hinweg. Die Gesamtzusammensetzung des Wassers und des Sediments war jedoch entlang der Proben nicht sehr unterschiedlich. Somit schien das Mikrobiom der RAS das Wasser oder Sediment stromabwärts des Systems im Vergleich zu den stromaufwärts gelegenen Mikrobiomen nicht nachteilig zu beeinflussen.

Der wesentliche weitere Arbeitsteil fand für den deutschen Partner an der Untersuchung einer Aquakulturanlage mit afrikanischen Welsen statt.

In den Versuchsanlagen des Instituts für Fischerei (IFI) wurden Afrikanische Welse (*C. gariepinus*) in Versuchskreislaufanlagen aufgezogen. Die Aufzucht erfolgte wie vorgesehen unter praxisnahen Bedingungen, wobei zwei unterschiedliche Produktionsintensitäten (Besatzdichten) jeweils in Dreifachwiederholungen realisiert wurden. Während der Laufzeit erfolgte eine regelmäßige Dokumentation der Fischbestandsentwicklung und die Probenahme zur Analyse technologisch relevanter Wasserqualitätsparameter sowie zur biologischen Besiedelung der Systeme.

Die Versuche wurden in insgesamt 6 gleichartigen, eingefahrenen Kleinkreislaufanlagen durchgeführt, d.h. je Besatzdichte standen drei parallele Anlagen zur Verfügung.

Eingesetzt wurden insgesamt 6 Versuchskreisläufe identischer Bauart (Zwei als Reservekreisläufe). Die Anlagen sind wie folgt aufgebaut (Abb 3):

- Gesamtvolumen ca. 900 l
- Fisch-Haltungsvolumen ca. 450 l
- Filtervolumen (Vorfilter, Absetzteil, Festbett-Biofilter, Pumpenabteil) ca. 430 – 450 l,
abhängig vom Füllstand)
- Belüftung (Druckluft in Haltebecken und Festbett-Biofilter)

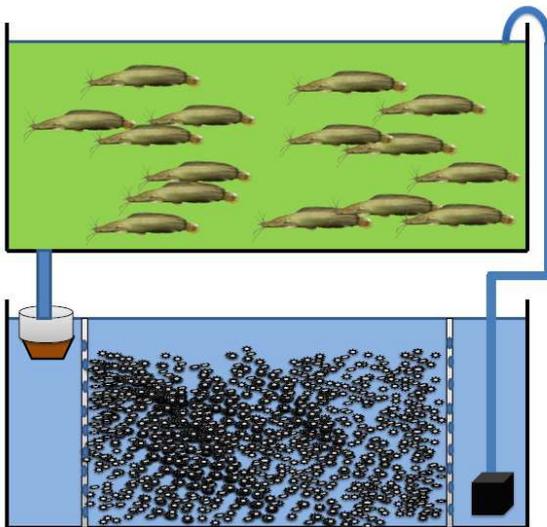


Abbildung 3: Versuchskreislauf (Schema)

Bei den Anlagen handelt es sich um einfache Versuchskreisläufe, die über ein Standrohr in den darunter angeordneten Filter entwässern. Das Filtersystem besteht aus einer mechanischen Vorfilterstufe (Grobsieb mit Nylonwatte), einem belüfteten Festbett-Biofilter (ca. 250 l) mit zylindrischen Füllkörpern als Schüttgut (DN 22 mm, Besiedlungsfläche: 240 m²/m³) und einer Pumpenkammer, die mit einer EHEIM-Tauchpumpe (Universal 2400) ausgestattet ist. Letztere fördert das Wasser aus dem Filtersystem zurück in das darüber befindliche Aquarium, wobei es stündlich zu einem kompletten Wasserdurchlauf kommt.

Die Anlagen wurden im Vollkreislauf gefahren. Für die Befüllung und den laufenden Betrieb der Anlagen wurde Starnberger Leitungswasser mit 20 – 25° dGH, 12 – 18° dKH und pH 7,5 – 7,8 verwendet.

Nach einer Einlaufphase für die Biofilter (Nitrifikationsfilter) und der Adaptation der Versuchsfische wird eine wöchentliche Dokumentation der Wasserqualität durchgeführt. Die bestimmten Parameter sowie die angewendete Methodik waren:

- Sauerstoffgehalt: Messung mit Handmessgerät WTW Oxi 3205
- pH-Wert: Messung mit Handmessgerät WTW pH 325
- Gesamthärte: Bestimmung Tetra GH-Test
- Karbonathärte: Bestimmung mit Tetra KH-Test
- Ammonium (NH₄⁺): Bestimmung mit Spectroquant (Merck, WTW-Photolab S 12)
- Nitritgehalt (NO₂⁻): Bestimmung mit Spectroquant (Merck, WTW-Photolab S 12)
- Nitratgehalt (NO₃⁻): Bestimmung mit Spectroquant (Merck, WTW-Photolab S 12)
- Elektrische Leitfähigkeit: Messung mit Handmessgerät WTW LF 320
- Salinität: Messung mit Handmessgerät WTW Oxi 3205
- Phosphorkonzentration (o-Phosphat): Bestimmung mit Spectroquant (Merck, WTW- Photolab)
- Gassättigung (Gesamtgas und Partialgase): Messung mit Gasstation Fisch- und Wassertechnik.

Aus jedem der 6 Biofilter wurde ein Filterkörper aus ca. 10cm Tiefe entnommen, mit einer mit Ethanol desinfizierten Schere zerkleinert und in eine 50ml Falcon-Tube gegeben und verschlossen. Die Proben wurden umgehend bei -20°C tiefgefroren. Dabei wurden zu jeder Zeit Einweghandschuhe getragen.

Aus jedem der 6 Haltungsbecken wurde eine Wasserprobe aus dem Freiwasser entnommen und mittels Vakuumfiltration durch Filterpapier filtriert. Es wurden zu jedem

Zeitpunkt Einweghandschuhe getragen. Hilfsmittel (Pinzetten), sowie der Trichter und die Auflage für das Filterpapier wurden nach jedem Durchlauf mit Ethanol desinfiziert. Je nach Verschmutzung des Anlagenwassers wurden 50ml bis 300ml je Kreislauf filtriert. Die aufgerollten, fertigen Filterproben wurden in 15ml Plastikgefäße gegeben, verschlossen und umgehend bei -20°C tiefgefroren.

Für die Untersuchungen wurden Afrikanische Welse (*Clarias gariepinus*, Setzlinge) eingesetzt. Folgende Einteilung bestand bei Versuchsbeginn:

- Versuchsgruppe 1 (V1) „geringe Besatzdichte“ in Becken 2A, 3A und 4A.
Jeweils 25 Fische/1725g Gesamtmasse
- Versuchsgruppe 2 (V2) „hohe Besatzdichte“ in Becken 5A, 6A und 7A.
Jeweils 40 Fische/2760g Gesamtmasse.

Der Besatz der Aquarien erfolgte, indem die zunächst adaptieren *Clarias*-Setzlinge auf die 6 Versuchskreisläufe mit hoher und geringer Besatzdichte aufgeteilt wurden. In drei Kreisläufen wurden 25 Welse mit einer Gesamtmasse von 1.725 g eingesetzt (mittlere Stückmasse 69 g), in den übrigen drei Kreisläufen wurden jeweils 40 Welse mit einer Gesamtmasse von 2.760 g eingesetzt (mittlere Stückmasse 69 g). In den ersten Tagen nach Besatz erfolgte die Qualitätskontrolle und Eingewöhnung der Fische an die Versuchsbedingungen mit Steigerung der täglichen Futtermenge auf Praxiswerte (4 % KG/d).

Gefüttert wurde ein Extrudat der Fa. „Spezialfutterwerke Beeskow GmbH“ (CLS 50/15 Ex und CLS 48/13 Ex) mit einem Gehalt von 50 % Rohprotein und 15 % Rohfett (2 mm), im späteren Versuchsverlauf 48 % Rohprotein und 13 % Rohfett (3 mm). Futtermenge wurde innerhalb der Parallelen gleich gehalten, sie wurde täglich neu berechnet und angepasst, d.h. die Fütterungsintensität wurde praxisüblich täglich verringert (anfangs 4%, zu Versuchsende 1,6%). Das Futter wurde täglich in der Zeit von 8.00 bis 14 Uhr etwa zur Hälfte in vier Portionen per Hand verabreicht, die restliche Futtergabe erfolgte kontinuierlich mittels Bandfutterautomaten (20.00 Uhr bis ca. 2.00 Uhr).

Die Gesamtfuttermenge pro Becken im Verlauf des Versuchs:

Versuchsgruppe 1 (Becken 2A, 3A und 4A): 8.081g

Versuchsgruppe 2 (Becken 2A, 3A und 4A): 12.961g

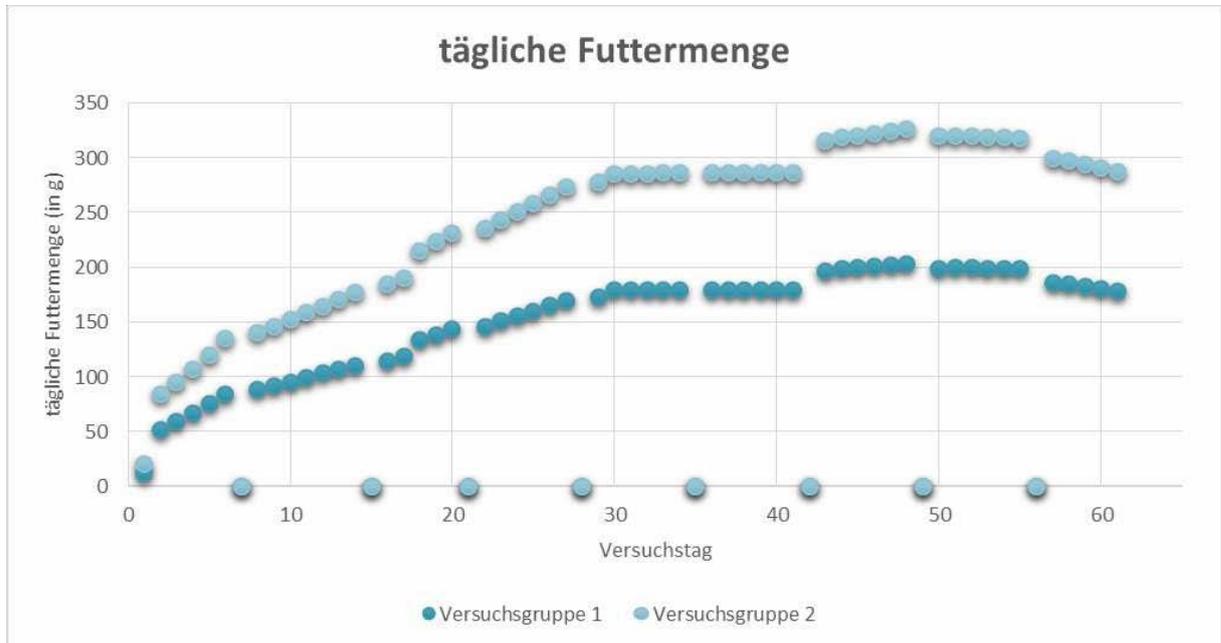


Abbildung 4: Verabreichte tägliche Futtermenge im Versuchsverlauf

Am Versuchsende ergaben sich folgende Daten zum Fischbesatz (Fischbiomasse):

Becken 2A: 22 Fische/10.871 g

Becken 3A: 24 Fische/11.379 g

Becken 4A: 24 Fische/11.002 g

Becken 5A: 38 Fische/18.380 g

Becken 6A: 36 Fische/17.746 g

Becken 7A: 38 Fische/18.527 g

Während des gesamten Versuchsverlaufs wurden Proben gezogen (wie oben beschrieben) und die entsprechende DNA extrahiert. Ausgewählte Proben wurden an den Projektpartner in Irland zur weiteren Analyse gesendet.

Um den Probenempfang zu reduzieren und auch die Budgetplanung nicht zu überschreiten wurde für ausgewählte Zeitpunkte DNA extrahiert. Diese ausgewählten Zeitpunkte waren der 12. Juni 2018 und der 27. Juni 2018 und der 1. August 2018. Die Extraktionsmethoden und auch die bioinformatische Analyse bzw. die Entwicklung

dieser sogenannten Pipeline dauerte etwas länger als ursprünglich geplant, da diese auch eng mit dem irischen Partner abgestimmt wurde. Zur Identifikation der Bakterientaxa und der Bakteriendiversität wurde eine Analyse der V2 Region der 16S RNA vorgenommen. Zusätzlich wird derzeit noch geprüft ob eine Analyse weiterer Regionen der 16S RNA mehr Informationen liefern würde, dies war jedoch aufgrund des begrenzten Budgets innerhalb dieses Projektes nicht möglich. Für alle Zeitpunkte wurden alle Replikate der jeweiligen Fischdichten und jeweils aus dem Wasser und aus dem Filter entnommen, sowie analysiert.

Abbildung 5 zeigt einen NDMS (Non-Dimensional Scaling) Plot der Beta Diversität der Bakteriengemeinschaft. Diese Abbildung kann bereits entnommen werden, dass die Gesamtdiversität der Bakterien zwischen den Hälterungsgruppen nicht deutlich verschieden ist. Es scheint hingegen einen Unterschied zwischen der Bakteriengemeinschaft im Wasser und der Bakteriengemeinschaft aus dem Filter der Anlage zu geben. Eine entsprechende statistische Analyse basierend auf einem PERMOVA Test bestätigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Bakteriengemeinschaft des Wassers und der Filter der Anlage ($R^2 = 0,14$, $P < 0,05$). Gleiches galt im Wesentlichen für die Analyse der Alpha Diversität mit Hilfe der Shannon und Simpson Indices.

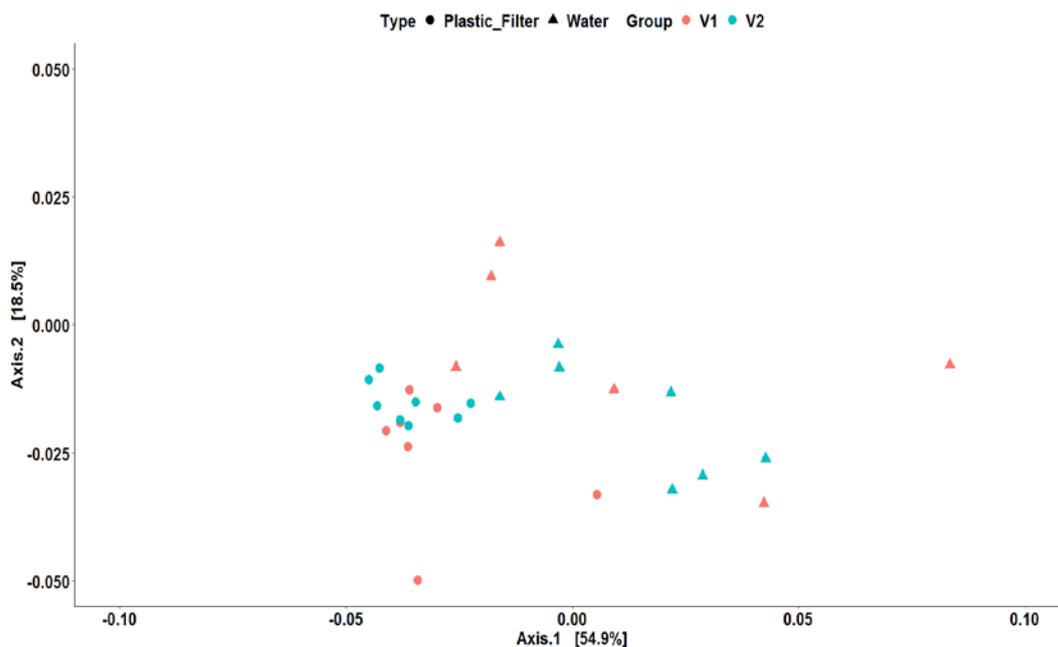


Abbildung: Die β -Diversitätsprofile der Bakteriengemeinschaft für das Wasser und den Filter der Anlage sowie der beiden Intensitäten der Hälterungen (V1 = 25 Fische, V2 = 40 Fische)

Abbildung 6 zeigt die relative Abundanz der unterschiedlichen Bakterienphyla, hier zeigt sich, dass die Verteilung der Phyla relativ stabil und ähnlich zwischen den unterschiedlichen Hälterungen sind. Lediglich für den 12. Juni sind im Becken 2W und 7W starke Veränderungen der Gemeinschaft zu beobachten, welche sich aber in den darauf folgenden Daten wieder stabilisiert haben. Dies deutet darauf hin, dass die Startbedingungen einer solchen Hälterung relativ robust sind und auf ein gemeinsames steady-state hinauslaufen. Die oben genannten Unterschiede zwischen den Filterproben und den Wasserproben sind auch hier ersichtlich. Aufgrund technischer Probleme konnte der Tank sieben am 27. Juni nicht beprobt bzw. analysiert werden.

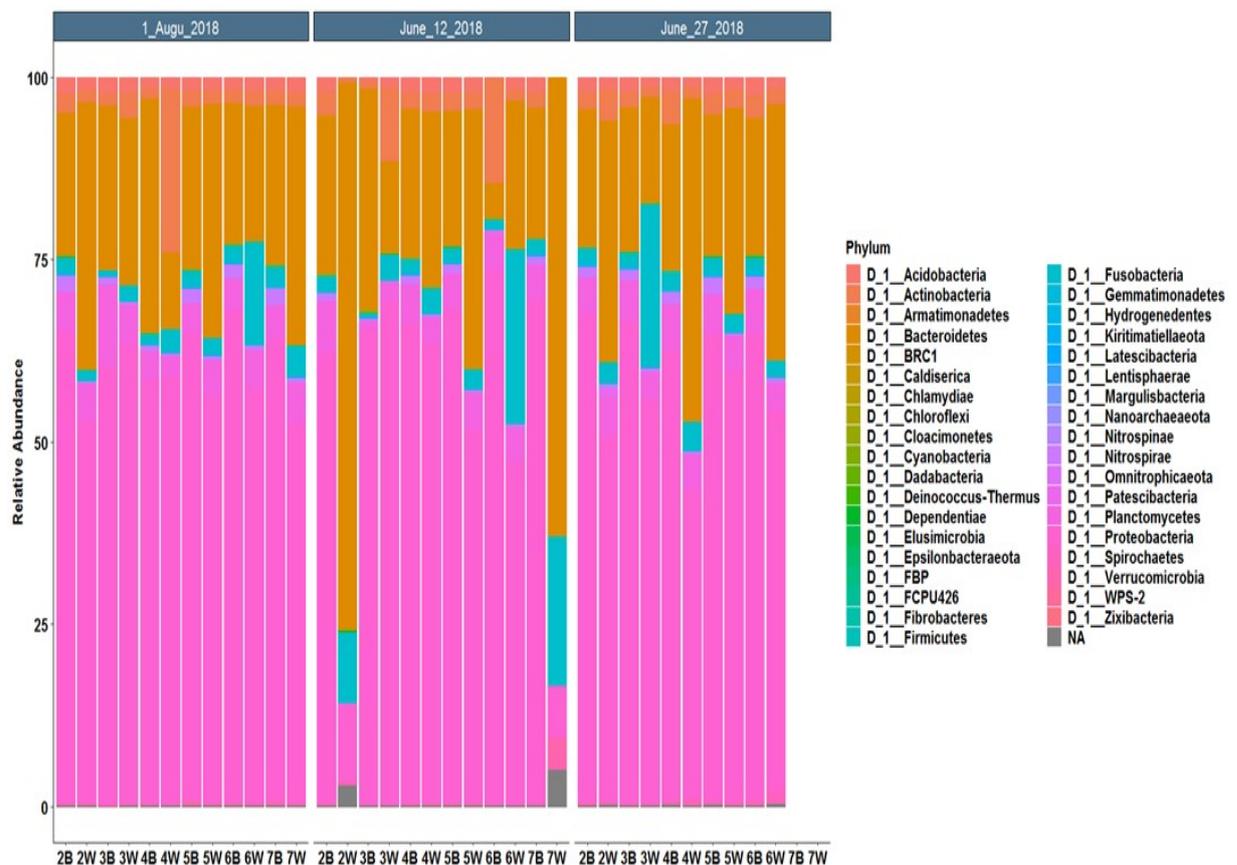


Abbildung 6: Die relative Abundanz der Bakterienphyla im Wasser (W) und im Biofilm des Filter (B) für die verschiedenen Hälterungsgruppen. Die Tanks 2,3 und vier gehören zur Gruppe der niedrigen Dichte (25 Fische) und die Tanks 5,6 und sieben gehören zu der Gruppe der hohen Dichte (40 Fische). Der Tank sieben konnte aufgrund technischer Probleme am 27. Juni nicht geprobt bzw. analysiert werden

Insgesamt ist die Bakterien Vielfalt in einem solchen Hälterungsbecken immer noch sehr hoch, sodass es schwierig ist einzelne Bakteriengruppen genauer zu verfolgen, bzw. Populationsentwicklung einzelner Gruppen kann durch die Dynamik der gesamten Bakteriengemeinschaft überlagert werden. Aus diesem Grund wurden die

Daten noch einmal mit einer anderen Bio-informatischen Pipeline bearbeitet unter anderem mit einem sogenannten trainierten bayesischen Klassifizierer (Version 13.2). Hier wurden spezifische Bakterien Genera ausgewählt, welche dafür bekannt sind dass sie im Zusammenhang mit Fischkrankheiten stehen. Die ausgewählten Genera waren *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Enterococcus*, *Escherichichia-Shigella*, *Flavobacterium*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Sphingomonas* und *Vibrio*. Die Resultate dieser Analyse sind in Abbildung 7 enthalten. Interessanterweise, spiegeln hier die Resultate aus dem Filter der Anlage zumindest qualitativ sehr gut die Dynamik im Wasser der Anlage. Darüber hinaus zeigt sich, dass potentielle pathogene welche bereits zu Beginn der Anlage vermehrt auftreten auch weiterhin im Verlauf des Versuches weiter dominant bleiben. Zudem sieht man für den Genus *Flavobacterium*, sowie für den Genus *Sphingomonas*, dass diese in den Hälterungen mit den höheren Fischdichten etwas stärker vertreten sind. Allerdings sind diese Resultate nicht signifikant und die Unterschiede bleiben nicht stabil bis zum Ende des Versuchsverlaufs.

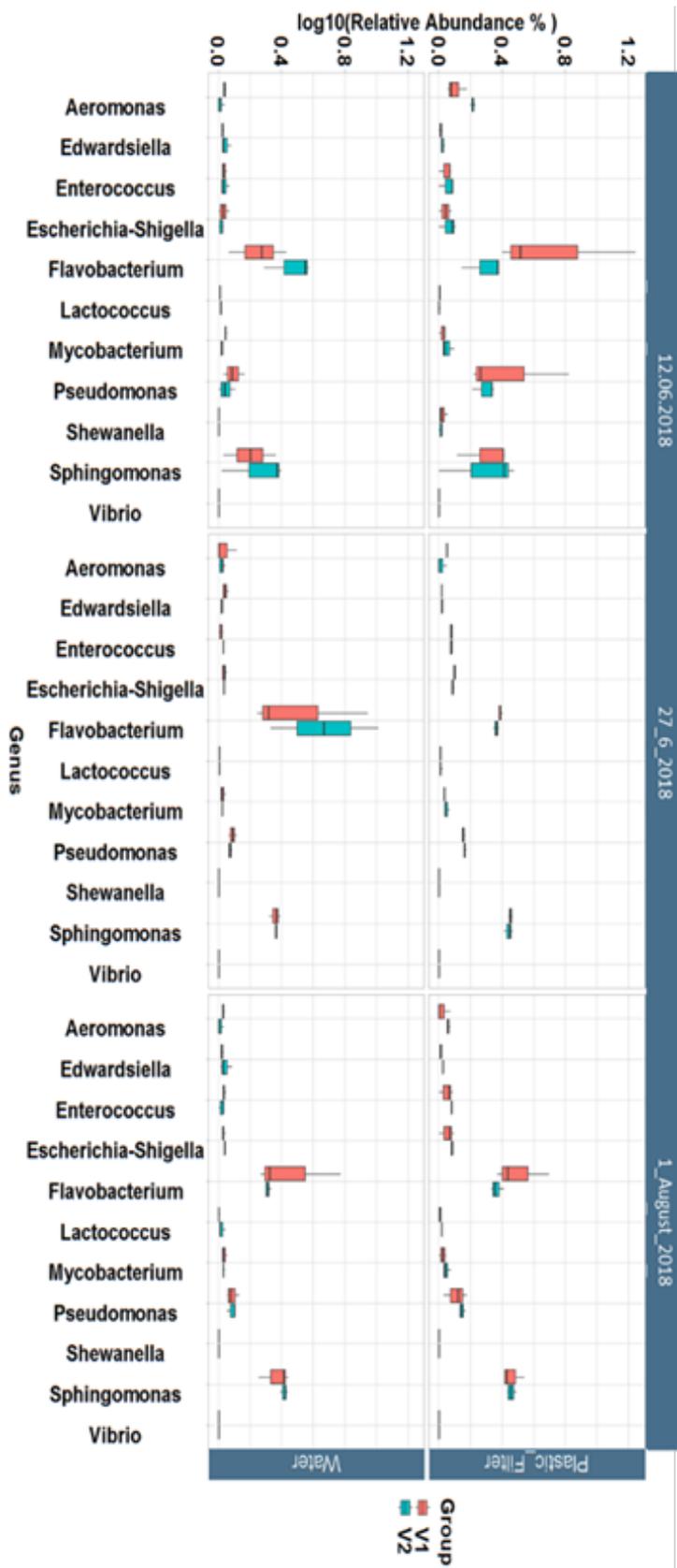


Abbildung 7: Die log-transformierte relative Abundanz (%) der Bakteriengenera, welche für Assoziationen mit Fischkrankheiten bekannt sind (V1: Tank mit 25 Fischen, V2: Tank mit 40 Fischen).

Zusätzlich zu den Analysen der Bakteriengemeinschaft wurden für ausgewählte Resistenzgene Quantifizierungen durchgeführt. Die ausgewählten Resistenzgene waren: *sul1*, *qnrS* und *bla_{TEM}*, da diese am besten mit den analysierten Resistenzklassen in dem rumänisch/finnischen Projekt übereinstimmen. Weitere Resistenzgene sind derzeit in Bearbeitung, um diese Resultate zu manifestieren. Jedoch konnten aufgrund des engen Budgets in diesem Projekt nicht mehr Gene analysiert werden. Interessanterweise stellte sich aber heraus, dass zum einen Resistenzgene detektiert werden konnten, ob wohl kein Antibiotikum eingesetzt wurde. Die Anzahl der Genkopien unterschied sich jedoch nicht zwischen den unterschiedlichen Dichten der Hälterungen (Abbildung 8 A – D). Aber es wurden für das Resistenzgen *bla_{TEM}*, ein gen welches für die Resistenz gegen Beta-lactamasen kodiert, signifikante Unterschiede zwischen dem Freiwasser und dem Biofilm gefunden. Die vorhergehenden Untersuchungen zeigten, dass die Unterschiede zwischen dem Filter und dem Freiwasser waren nicht signifikant verschieden für die pathogenen Bakterien, aber für die gesamte Bakteriengemeinschaft.

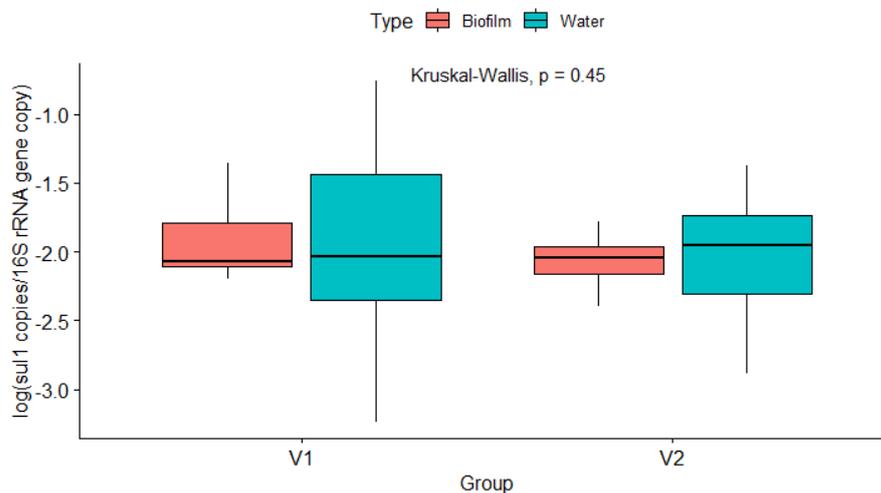


Abbildung 8A: Relative Abundanz der *sul1* (gene copies/16S rRNA) im Wasser und Filter der Anlage V1 (25 Fische) und V2 (40 Fische).

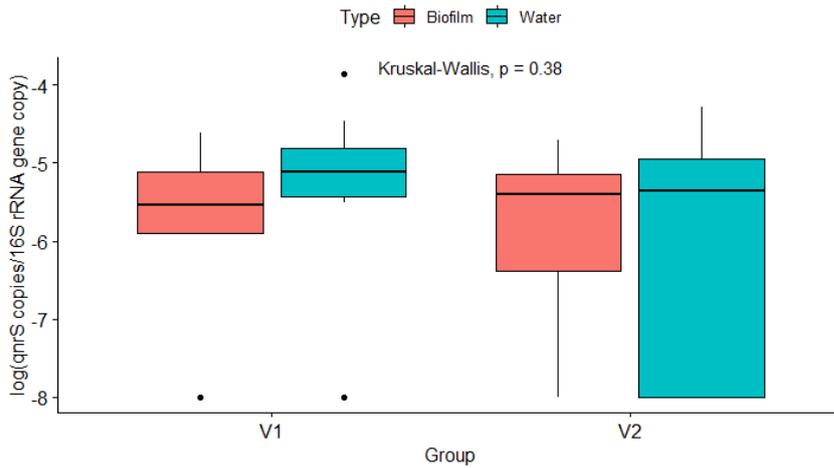


Abbildung 8B: Relative Abundanz der *qnrS* (gene copies/16S rRNA) im Wasser und Filter der Anlage V1 (25 Fische) und V2 (40 Fische).

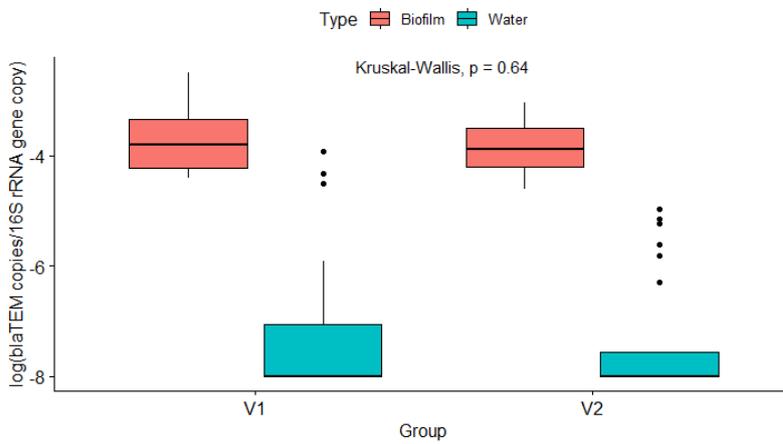


Abbildung 8C: Relative Abundanz der *bla_{TEM}* (gene copies/16S rRNA) im Wasser und Filter der Anlage V1 (25 Fische) und V2 (40 Fische).

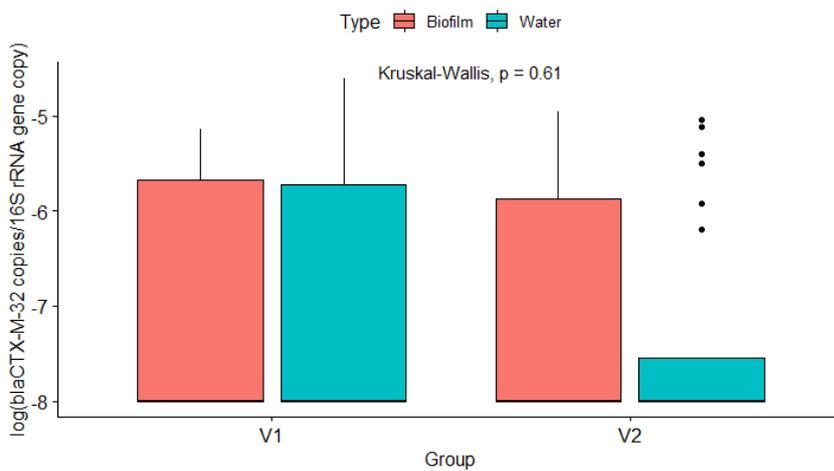


Abbildung 8D: Relative Abundanz der *bla_{CTX-M-32}* (gene copies/16S rRNA) im Wasser und Filter der Anlage V1 (25 Fische) und V2 (40 Fische).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine höhere Dichte in der Hälterung zu keiner nachhaltigen Veränderung der gesamten Bakteriengemeinschaft führt. Auch die Abundanz der pathogenen Bakterien zeigen keine signifikante Erhöhung. Darüber hinaus führt eine dichtere Hälterung zu keiner Erhöhung der Resistenzgene. Die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft in den Filtern ist signifikant verschieden von der Bakteriengemeinschaft im Freiwasser, insbesondere die Proteobakterien zeigen eine höhere Abundanz in dem Filtersystem. Dies spiegelt sich jedoch nicht in den Abundanzen der pathogenen Bakterien wieder. Entsprechend liegen die Ergebnisse nahe dass die Analyse der Filter benutzt werden kann, um die Anlage bezüglich pathogene Bakterien zu überwachen. Eine Überwachung der Resistenzgene hängt von der Auswahl der Gene ab und kann nicht als eine generelle Maßnahme in Betracht gezogen werden.

Zum WP5 (5.1): Zur Information der Öffentlichkeit wurde für das Gesamtprojekt eine Projekt-Website veröffentlicht, die unter www.abaware.com zu erreichen ist und auf die seitens des deutschen Projektpartners über die Institutshomepage verwiesen wird. Im Rahmen verschiedener Umweltbildungsaktionen, an denen das IHB beteiligt war (u. a. Lange Nacht der Wissenschaften), wurde zusätzlich durch Mitarbeiter des IHB über das Projekt informiert. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse mit ausgewählten Vertretern der Aquakultur im privaten und öffentlichen Bereich diskutiert und evaluiert. Die Ergebnisse dieses Projektes sind darüber hinaus in das Curriculum der TU Dresden eingeflossen. Weiterhin sind die Ergebnisse dieses Projektes in die Ausbildung der Lehrlinge am Institut für Fischerei in Starnberg eingeflossen. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse in mehreren Vorträgen vorgestellt und dies hat unter anderem dazu geführt, dass die Ergebnisse dieses Projektes auf einer Veranstaltung der EFSA in Parma stattfand und Thomas Berendonk als Experte für ein wissenschaftliches Papier der EFSA berufen wurde, um dort unter anderem aufgrund der Ergebnisse des Projektes Informationen zur Antibiotikaresistenz in Aquakulturen zusammen zu fassen.

Insgesamt war die Projektlaufzeit von zwei Jahren eher etwas zu kurz, da die vorbereitenden Arbeiten sehr viel mehr Zeit in Anspruch genommen haben als ursprünglich geplant war. Durch die sehr gute Abstimmung zwischen den unterschiedlichen Projektpartnern, konnte das Projekt aber dennoch innerhalb des geplanten Zeitraumes durchgeführt werden. Array Analysen und weitere Meta Genomik-Analysen stehen noch aus, waren aber innerhalb des geplanten Budgets nicht zu realisieren. Entsprechend gab es keine Arbeiten zu keiner Lösung geführt

haben. Jedoch gibt es Ergebnisse die einer weiteren Analyse bedürfen. Entsprechend wurden durch unterschiedliche Mitglieder des Konsortiums bereits Folgeanträge im Rahmen einer EU Förderung geschrieben, jedoch bisher keine positiv beschieden.

3. Sind inzwischen von dritter Seite (FE-)Ergebnisse bekannt geworden, die für eine mögliche Fortführung des Vorhabens relevant sein können? Wenn ja, bitte ausführen.

Dazu sind uns bisher keine bekannt, außer einer generellen Betrachtung der Resistenzbelastung in europäischen Aquakulturen. Diese wird aber von der hier berichtenden Institution für die European Food Agency (EFSA) durchgeführt. Insgesamt ist sicher eines der wesentlichen Ergebnisse dieses Projektes, dass die Ergebnisse in die Beurteilung von Aquakultur und Antibiotikaresistenz in ein eine wissenschaftliche Beurteilung für die EFSA einfließen (BIOHAZ-Gruppe).

4. War der Einsatz der Bundesmittel für die Erreichung des geplanten Vorhabensziels ursächlich oder wäre dieses Ziel auch ohne Bundesmittel erreicht worden (einschließlich Bewertung evtl. Mitnahmeeffekte)?

Dieses Projekt bzw. die Erreichung der geplanten Vorhabensziele wären ohne die Bundesmittel nicht erreicht worden.

5. Auflistung der erfolgten und geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses (Zitierung bzw. Belegexemplar).

Es sind derzeit zwei wissenschaftliche Veröffentlichungen durch das gesamte Konsortium geplant und in Vorbereitung. Da es eine gewisse Diskrepanz zwischen dem Ende der nationalen Teile von ABAWARE gegeben hat, wird erwartet, dass die Ergebnisse und ihre Veröffentlichung und Verbreitung nicht vor Ende 2019 und bei einigen Publikationen erst nach 2020 abgeschlossen sein werden. darüber hinaus wurde ein Überblick über Aquakultur in Europa und Antibiotikaresistenz für die EFSA verfasst. Dieser ist jedoch noch nicht freigegeben und kann daher hier noch nicht dargestellt werden.

6. Tabellarische Aufführung durchgeführter Maßnahmen des Wissenstransfers bzw. Bildung/Weiterbildung im Einzelvorhaben und – sofern erfolgt – im Kontext des EU-Gesamtvorhabens

Vortragender	Organisation und Jahr	Titel
Berendonk	DWA, Dessau 2018	Antibiotikaresistenz und Aquakultur, Nereus und ABWARE
Berendonk	EFSA, Parma2018	Water-reuse and Aquaculture implications for food safety
Berendonk	HEARD, Zürich2018	Antibiotic resistance in the environment
Berendonk	Universität Innsbruck 2019	Antibiotic resistance in the environment
Berendonk	PEAK, 2018 (EAWAG)	An overview on antibiotic resistance in water and aquaculture
Berendonk	Austrian Agency for Health and Food Safety 2019 Wien	Human – Animal – Environment Ecosystem Interfaces: Bottlenecks for Antibiotic Resistance Gene Transfer ?
Berendonk	Universität Köln 2019	Antibiotikaresistenz in der Umwelt und Aquakultur

Zusammenfassung des EU- Gesamtverbundes:

Englisch:

The RAS-based aquaculture is developing with high speed in several countries and has a large potential in producing aquaculture products close to the markets since the technology makes it possible to perform industrial aquaculture without the need of large resources of clean water. The consortium of Partners in ABAWARE is focused on developing aquaculture facilities that produce high quality food products without the need of using antibiotics to control disease in the farmed fish. The novel overlap of the three main research areas in ABAWARE is kept together through the recognition of the importance of the wide microbial activities involved in the RAS systems. Through handling of the organic contents in the water with fish via the biofilter and through upgrading the organic sediments from the RAS system and not at least through realizing the importance of the microbiota of the RAS system in keeping the fish healthy as a resource for high quality food for human consumption, it is possible to make a sustainable biological industry for the future. The ABAWARE project has been working coordinated in identifying microorganisms that can improve the biofilters of aquaculture RAS systems. These microorganisms are bacteria, fungus and microalgae but also some plant species are tested. Various existing RAS facilities for salmonid cold water species and warm water species as African catfish are used as resources for identifying important microorganisms. However, other sources like wood eating insects are also used for identifying optimal organisms. There is a close collaboration between research laboratories, research facilities for fish and commercial systems for human sewage handling. At the end of ABAWARE various microorganisms are isolated and ready to be introduced to lab-scale and prototypes of commercial systems that can handle both water and sediments from RAS systems for freshwater fish aquaculture.

Deutsch:

Die RAS-basierte Aquakultur entwickelt sich in mehreren Ländern mit hoher Geschwindigkeit und verfügt über ein großes Potenzial zur marktnahen Produktion von Aquakulturprodukten, da die Technologie es ermöglicht, industrielle Aquakultur ohne große Ressourcen an sauberem Wasser durchzuführen. Das Konsortium der Partner in ABAWARE konzentriert sich auf die Entwicklung von Aquakulturanlagen, die qualitativ hochwertige Nahrungsmittel produzieren, ohne dass Antibiotika zur Bekämpfung von Krankheiten bei den Zuchtfischen eingesetzt werden müssen. Die neuartige Überschneidung der drei Hauptforschungsbereiche in ABAWARE wird durch die umfangreichen mikrobiellen Aktivitäten in den RAS-Systemen realisiert. Durch den Umgang mit den organischen Inhaltsstoffen im Wasser mit den Fischen sowie den Biofilter und durch die Aufwertung der organischen Sedimente aus dem RAS-System und nicht zuletzt durch die Analyse der Mikrobiota des RAS-Systems für die Gesunderhaltung der Fische als Ressource für qualitativ hochwertige Lebensmittel ist es möglich, eine nachhaltige biologische Industrie für die Zukunft zu schaffen. Das ABAWARE-Projekt hat an der Identifizierung von Mikroorganismen gearbeitet, welche die Biofilter von Aquakultur-RAS-Systemen verbessern können. Bei diesen Mikroorganismen handelt es sich um Bakterien, Pilze und Mikroalgen. Verschiedene bestehende RAS-Anlagen für Salmoniden-Kaltwasserarten und Warmwasserarten wie Afrikanische Welse werden als Ressourcen zur Identifizierung wichtiger Mikroorganismen genutzt. Es besteht eine enge Zusammenarbeit zwischen Forschungslabors, Forschungseinrichtungen für Fische und kommerziellen Systemen für den Umgang mit menschlichem Abwasser.