

Zahlungsempfänger:

Hochschule für Technik und Wirtschaft des Saarlandes (htw saar)

Förderkennzeichen:
2814ERA02G

Aktenzeichen:
315-06.01-2814ERA02G

Vorhabensbezeichnung:

Verfahren zur Stabilisierung von Bakteriengemeinschaften in
landbasierten Aquakultursystemen (MicStaTech)

Teilprojekt 4:
**Fischgesundheit und Systemverhalten in marinen
K-selektierten Systemen**

Laufzeit des Vorhabens:
1.4.2015 bis 30.4.2018

Abschlussbericht

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen, auch zwecks Evaluierung von Förderprogrammen

Die Fischindustrie in Deutschland berichtet, dass 2017 1,1 Millionen Tonnen Lebensmittel aus Fischerei und Aquakultur (Seefischerei, Binnenfischerei, Aquakultur) verkauft wurden. Davon wurden 0,29 Millionen Tonnen oder 26% aus eigener Erzeugung gedeckt. Inklusive der Rohware für die Industrie wurden 2017 aber 1,9 Millionen Tonnen Fischereierzeugnisse verbraucht, sodass die Eigenversorgung insgesamt nur ungefähr 16 % betrug¹. Zu den Zielen in Deutschland gehört deshalb auch die Förderung einer nachhaltigen, wettbewerbsfähigen und ausgewogenen, integrativen Fischerei und Aquakultur. Aus den Zahlen lässt sich eine mögliche Unsicherheit in der Versorgung ableiten, die sich nur durch eine gezielte Entwicklung von modernen Produktionssystemen in Deutschland auflösen lässt.

Aquakultur kann in Deutschland nur erfolgreich sein, wenn ihre Wirtschaftlichkeit und Akzeptanz durch Lösungen für folgende Problemfelder erhöht wird:

- | | | |
|----|------------------------|---|
| 1. | Umweltschutz | durch Entkoppelung von der Umwelt. |
| 2. | Verbraucherschutz | durch Vermeidung von Kontamination und Sicherstellung der Nachverfolgbarkeit. |
| 3. | Lebensmittelsicherheit | durch kontrollierte Produktionsabläufe. |
| 4. | Produktionssicherheit | durch optimal an die Biologie angepasste Verfahren und Vermeidung von Umweltgefahren. |
| 5. | Breites Artenspektrum | durch Einstellung der Umweltbedingungen. |
| 6. | Nachhaltigkeit | durch optimale Stoffverwertung und Energie-recycling. |
| 7. | Ressourcenschutz | durch Reduktion des Flächenbedarfs, des Wasserverbrauchs und durch den effizienten Einsatz von Futtermitteln. |

Eine Entwicklung, die die oben angeführten Probleme aufnimmt und weitgehend löst, ist die marine Fischzucht im Südwesten Deutschlands. Die Meeresfischzucht in Völklingen, sie firmiert heute unter *Fresh Völklingen GmbH*, produziert seit 2013 in Südwestdeutschland in vier hochmodernen, marinen Rezirkulierenden Aquakultur Systemen (RAS). Die Prozesstechnik dieser Anlage ist weltweit führend. Sie basiert auf zwei Jahrzehnten intensiver Forschungs- und Entwicklungsarbeit^{2,3}. Im Gegensatz zu konventionellen Kreislaufanlagen mit

¹ Fischwirtschaft, Daten und Fakten 2018. Hrgr. Fisch-Informationszentrum e.V. ISBN 978-3-9818205-2-2

² Waller (2012) Aquakultur im Fokus. Schrift der htw saar zur Woche der Umwelt der Deutschen Bundesstiftung Umwelt. https://www.researchgate.net/publication/288828819_Aquakultur_im_Fokus

³ Orellana J, Waller U, Wecker B (2014) Culture of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in a marine recirculating aquaculture system (RAS) with artificial seawater. *Aquacultural Engineering* 58:20–28. doi: 10.1016/j.aquaeng.2013.09.004

einer minimalen Prozesskette, setzt das von Professor Waller vorgeschlagene Konzept auf optimale Haltungsbedingungen, wie in der Abbildung 1 dargestellt wird. Das Konzept und die Umsetzung in einem Produktionsbetrieb wirtschaftlicher Produktionsgröße hat international großes Interesse hervorgerufen und zu der Aufforderung geführt, im Projekt MicStaTech mit Kollegen aus Universitäten in Skandinavien zu arbeiten, das die Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften und deren Entwicklung in unterschiedlichen Aquakultursystemen zum Ziel hat.



Abbildung 1: Blick in einen Produktionstank eines modernen Kreislaufsystems für die Produktion von Wolfsbarschen, *Dicentrarchus labrax*. Die moderne Prozesstechnik⁴ erlaubt, die Lebensbedingungen für die Tiere weitgehend an ihren natürlichen Lebensraum anzupassen.

Die neue RAS Technologie bietet Meeresfischen einen artverträglichen Lebensraum. Gleichzeitig erlaubt die Technik eine endverbrauchernahe Produktion von frischen Meeresfischen ohne einen direkten Zugang zum Meer. Die fortgeschrittene Prozesstechnik verhindert den Einsatz von Pharmazeutika, insbesondere von Antibiotika, dadurch, dass auch für Mikroorganismen Abreicherungsprozesse vorgesehen wurden. Dieses Konzept setzt sich immer stärker in der internationalen Aquakultur durch. Viele bereits produzierende Anlagen werden heute gemäß diesem Konzept technisch aufgerüstet, um Aquakultur umweltkompatibel zu machen, die Produkte zu verbessern und dem Tierschutz zu entsprechen.

Der im Projekt verfolgte Ansatz ist die Entwicklung einer K-selektionierten Bakteriengemeinschaft in einer stabilen Umwelt. Die K-Selektion ist dabei aus dem ökologischen Nischenmodell abgeleitet, demzufolge sich Pflanzen oder Tiere vorhandene Ressourcen im Lebens-

⁴ Siehe Orellana et al 2014, Zitat 3, Seite 2

raum teilen. Arten mit ähnlichen Bedürfnissen konkurrieren miteinander. Neu hinzukommende Arten haben es daher schwer, sich in diesem stabilen Ökosystem zu etablieren. Auf Bakteriengemeinschaften in Aquakulturen übertragen⁵ bedeutet das, dass Bakterien in robusten Gemeinschaften um Nährstoffe (gelöste organische Verbindungen, Ammonium, Sauerstoff, Nitrat) konkurrieren und diese dadurch bis zur Kapazitätsgrenze ausschöpfen. Durch die Konkurrenz werden die Nährstoffkonzentrationen niedrig gehalten. Dies verhindert die Vermehrung von opportunistischen Bakterien, die ihre typischen, hohen, Reproduktionsraten (r-Selektion) nur dann entfalten können, wenn Nährstoffe im Überfluss vorhanden sind. Eine Abtötung von Bakterien, die lediglich zur Auflösung ihrer zellulären Struktur führt aber die tote Biomasse nicht unmittelbar aus dem Prozess entfernt, bringt genau diesen Nährstoffüberfluss ins Kreislaufsystem, der r-Strategen fördern würde und wäre somit kontraproduktiv. Bei der in der Meeresfischzucht eingesetzten Prozesstechnik werden Bakterien durch eine zweifach ausgelegte Partikelseparation über Trommelfilter und Flotation kontinuierlich aus dem Prozesswasser abreichert.

Damit sich Bakteriengemeinschaften in RAS entwickeln, die in der Lage sind, die gelösten organischen Reststoffe aus einer intensiven Fischzucht zu remineralisieren, ohne dabei mit den Fischen um Sauerstoff zu konkurrieren oder ihr Immunsystem durch eine übermäßige Keimzahl zu schwächen, werden in Biofiltern Oberflächen bereitgestellt, auf welchen Bakterien Biofilme ausbilden. Eine unkontrollierte Vermehrung von opportunistischen Bakterien, die zum Ausbruch von Fischkrankheiten und erhöhter Fischsterblichkeit (Mortalität) führen könnte, wird durch den von diesen Biofilmen erzeugten Nährstoffmangel verhindert. Dadurch kann ein weiteres Ziel des nationalen Strategieplans Aquakultur erreicht werden, nämlich die Erhöhung der Fischgesundheit und Verringerung der Mortalität in Aquakulturen.

Wie im folgenden Bericht gezeigt wird, können nitrifizierende Bakterien bei richtiger Auslegung des Biofilters die Konzentrationen von Ammonium und Nitrit, wie für eine K-Selektion gefordert, niedrig halten. Im Biofilter werden diese beiden Giftstoffe in das weniger giftige Nitrat umgewandelt. Die Bakterien eines zweiten, denitrifizierenden Biofilters waren dagegen oft nicht in der Lage, dieses Nitrat durch Umwandlung in Stickstoff (N₂) zu entfernen. Dies führte zu unerwünscht hohen Nitratkonzentrationen im Prozesswasser der Kreisläufe⁶. Die

⁵ Schryver P de, Vadstein O (2014) Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. ISME J 8:2360–2368. doi: 10.1038/ismej.2014.84

⁶ van Bussel CGJ, Schroeder JP, Wuertz S, Schulz C (2012) The chronic effect of nitrate on production performance and health status of juvenile turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture 326-329:163–167. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.11.019

oben genannten Ziele der Aquakulturstrategie erfordern deshalb neue, automatisierbare Verfahren zur Stabilisierung der Denitrifikation. Ein solches Verfahren wurde an der htw saar unter Mitwirkung des Projekts MicStaTech entwickelt und als Erfindung gemeldet (PVA Saarbrücken, Aktenkennzeichen 2018/44).

Mit der Weiterentwicklung der Prozesse in RAS arbeitete das Projekt grundsätzlichen Zielen zu, die im *Nationalen Strategieplan Aquakultur für Deutschland* für Kreislaufanlagen für die Fischzucht festgeschrieben sind:

1. Vergleichsweise große Unabhängigkeit von Standort und Oberflächenwasser.
2. Jahreszeitenunabhängige Produktion.
3. Sehr guter Seuchenschutz durch geringen Austausch mit Umwelt.
4. Gefahrlose Haltung von nicht heimischen Arten.
5. Nährstoffeinträge in natürliche Vorfluter ganz oder weitgehend vermeidbar.
6. Investitionsinteresse aus der Wirtschaft, auch aus aquakulturfernen Bereichen.

Das Projekt passte zu dem an der htw saar verfolgten Ziel, die im *Nationalen Strategieplan Aquakultur für Deutschland* für Kreislaufanlagen für die Fischzucht aufgeführten Limitierungen durch angewandte Forschung und Entwicklung von neuen Prozesstechniken zu lösen.

2. Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse des Vorhabens im Vergleich zu den ursprünglichen Zielen, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen.

2.1. Projektziele

Im Mittelpunkt des deutschen Beitrags zum europäischen Projekt MicStaTech stand die Charakterisierung der Bakteriengemeinschaft (des Mikrobioms) in von Professor Waller und Mitarbeitern entwickelten, geschlossenen Aquakultursystemen. Eine Anwendung des „Next Generation Sequencing“ (NGS)⁷ erlaubt es, die Zusammensetzung des Mikrobiom und dessen zeitliche Veränderungen anhand von typischen DNA-Sequenzen des Gens der 16S riboso-

⁷ Eine gute Beschreibung der Methode ist im Englisch-sprachigen WIKIPEDIA unter „16S ribosomal RNA“ (18.2. 2019) zu finden

malen RNA zu untersuchen. Einflüsse der Zuchttiere und der Prozesse in der Wasseraufbereitung sollten erfasst und neue Erkenntnisse für die Entwicklung von Verfahren zur mikrobiellen Stabilisierung von kreislaufgeführten Aquakulturen gewonnen werden.

Im Teilprojekt 4 sollten nach der Klärung von methodischen Fragen bezüglich der Probenahme (AP1, MS1) zwei Langzeitbeobachtungen des Mikrobioms in je einer mit *Sparus aurata* (Dorade) und einem mit *Dicentrarchus labrax* (Wolfsbarsch) besetzten marinen RAS durchgeführt werden (AP2, AP3, MS2 MS3). Mögliche Veränderungen sollten mit dem Zustand des Prozesswassers und der Fische in Bezug gesetzt werden. Die Hypothese einer K-Selektion bei geringem Wasseraustausch und weitgehend konstanten Prozessbedingungen sollte geprüft werden. Daten aus diesen Untersuchungen sollten den Teilprojekten 3 und 5 für die Modellvalidierung zu Verfügung gestellt werden (AP4, MS4).

Ein weiteres Ziel von MS4 war die Entwicklung von Algorithmen zur Analyse und Bewertung von großen Datensätzen, die bei der Methode des „Next Generation Sequencing“ anfallen. Mit bioinformatischen Methoden soll ein schnelles, von Kultivierung und Vorwissen unabhängiges Diagnoseverfahren entwickelt werden, um die Anwesenheit eines bestimmten Krankheitserregers (Pathogen) für die Aquakultur nachzuweisen.

2.2. Material und Methoden

Kreislaufanlagen

Um in einem geschlossenen Produktionssystem für Fische die Wasserqualität auf höchstem Niveau zu halten, ist eine ständige Klärung durch eine integrierte Wasseraufbereitung erforderlich⁸. Partikuläre organische Reststoffe, insbesondere Fischausscheidungen, Abriebe von Biofilmen, sowie suspendierte Bakterien und Proteine werden mit zwei Trommelfiltern und einem mit einem Luft-Ozon Mischgas betriebenen Flotationsapparat (Schaumbildung mittels gelösten organischen, oberflächenaktiven Substanzen) im Prozesswasser abgereichert.

Um gelöste Ausscheidungsprodukte zu entfernen, werden Bakterien in einem gut belüfteten, aeroben, nitrifizierendem Biofilter kultiviert. Diese Bakterien remineralisieren gelöste, organische Bestandteile und oxidieren das von den Fischen exkretierte, giftige Ammoniak, ein Nebenprodukt des Proteinstoffwechsels zu Nitrat (Nitrifizierung).

⁸ Orellana et al. (2014) siehe Zitat 3, Seite 2

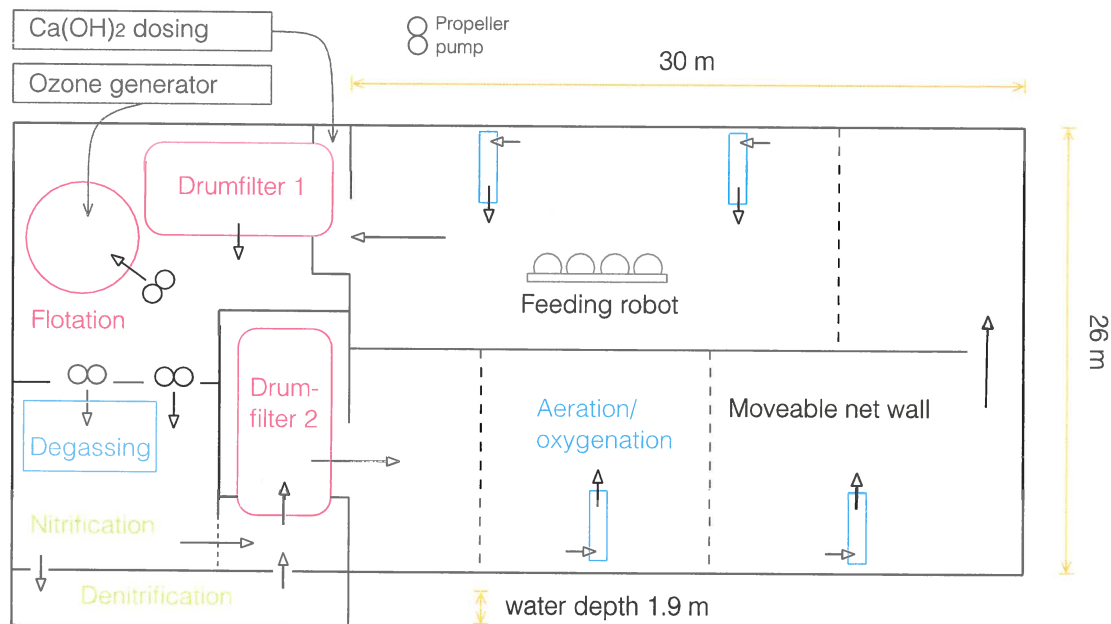


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Prozesskomponenten in der Meeresfischzucht in Völklingen.

In vielen Aquakulturen wird das Nitrat durch regelmäßige Verdünnung des Prozesswassers mit Frischwasser in einem für die Fische erträglichen Konzentrationsbereich gehalten⁹. In den hier untersuchten Anlagen wird Nitrat in einem zweiten Biofilter von denitrifizierenden Bakterien in molekularen Stickstoff (N₂) umgewandelt, der das RAS gefahrlos verlassen kann. Dadurch wird ein äußerst wichtiges Ziel des deutschen Strategieplans Aquakultur erreicht, nämlich die Senkung des Frischwasserverbrauchs von Aquakulturanlagen. Wie diesem Bericht dargestellt wird, funktionierten diese Biofilter in den bestehenden Anlagen nicht immer mit der notwendigen Zuverlässigkeit, sodass die hier erarbeiteten Ergebnisse besondere Bedeutung für die weitere Entwicklung der RAS-Technologie haben.

Die Meeresfischzucht in Völklingen (Abbildung 2, Abbildung 3), die von der *Fresh Völklingen* GmbH betrieben wird, verfügt über vier unabhängige RAS mit künstlichem Meerwasser für die Produktion von marinen Speisefischen. Jedes RAS hat ein Prozesswasservolumen von 2.500 m³. Ca. 1.700 m³ des Prozesswassers befinden sich im Produktionsbecken, das aus

⁹ Badiola M, Mendiola D, Bostock J (2012) Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacult Eng* 51:26–35. DOI: 10.1016/j.aquaeng.2012.07.004

zwei miteinander verbundenen rechteckigen Tanks besteht. Um mehrere Altersgruppen (Kohorten) einer Fischart aufzunehmen, ist das Becken mit Netzen in Kompartimente unterteilt, deren Haltungsvolumen an Fischgröße und maximale Besatzdichte ($50 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$) angepasst sind. Das von den Fischen verschmutzte Wasser wird aus dem Produktionsbecken in die Wasseraufbereitung gepumpt und läuft von dort zurück in den vorderen, mit den jeweils jüngsten Fischen (Fingerlingen) besetzten Teil des Produktionsbeckens. Um optimale Bedingungen für Fischgesundheit und Wachstum zu garantieren, sollte das Wasser des Produktionsbeckens dreimal pro Stunde die Wasseraufbereitung durchlaufen (mittlere Verweilzeit des Wassers: 20 Minuten¹⁰).

Die Wasseraufbereitung (Abbildung 3) umfasst zwei Trommelfilter zur Entfernung von Partikeln größer als $50 \mu\text{m}$, einem mit Luft-Ozon Mischgas betriebenen Flotationsapparat zur Entfernung von kleinen Partikeln (Feintrübe) und Proteinen sowie jeweils einem Biofilter zur Entfernung gelöster Nährstoffe mittels bakterieller Nitrifikation und Denitrifikation. Das RAS1 wurde im Februar 2013 mit ca. 90.000 Jungfischen der Art *Sparus aurata* besetzt. In vierteljährlichem Abstand wurden jeweils 3 weitere, vergleichbar große Jungfischkohorten dazu gesetzt. Untersuchungen im Rahmen von MicStaTech begannen am 1. April 2015, also mehr als zwei Jahre nach Erstbesatz.

Das experimentelle RAS der htw saar umfasste 9 m^3 Prozesswasser wovon sich ca. 6 m^3 im Produktionsbecken befanden. Die mittlere Verweilzeit des Prozesswassers betrug, bis auf wenige Ausnahmen, 20 Minuten. Die Wasseraufbereitung umfasste die oben genannten Komponenten in entsprechend reduzierter Größe¹¹. Das experimentelle RAS wurde im Februar 2016 nach einem 5-wöchigen Leerbetrieb mit 1.520 Fingerlingen der Art *D. labrax* besetzt, die die Eingangskontrolle der *Fresh Völklingen* erfolgreich durchlaufen hatten. Nachdem die Fische eine in kommerziellen Aquakulturen übliche Dichte von 40 kg/m^3 im Produktionsbecken erreicht hatten, wurde der Bestand konstant gehalten, indem alle zwei Wochen 100 – 150 Tiere an die *Fresh Völklingen* zurückgegeben wurden.

¹⁰ Orellana et al., 2014 Siehe Fußnote 3, Seite 2

¹¹ Waller U, Buhmann AK, Ernst A, Hanke V, Kulakowski A, Wecker B, Orellana J, Papenbrock J (2015) Integrated multi-trophic aquaculture in a zero-exchange recirculation aquaculture system for marine fish and hydroponic halophyte production. *Aquacult Int* 23:1473–1489. doi: 10.1007/s10499-015-9898-3



↑ A



↑ B

Abbildung 3: Panoramaaufnahmen von einem Produktionstank (A) und der Wasseraufbereitung (B) der Meerestischzucht in Völklingen. Die Prozesskomponenten sind in Abbildung 2 dargestellt.

Probennahme und Wasseranalysen

Chemische Wasseranalysen wurden 2 – 3 Mal pro Woche durchgeführt. Die Wasserproben wurden am Auslauf des Produktionsbeckens (= Einlauf in die Wasseraufbereitung) entnommen. Die Bestimmungen der Konzentrationen von Ammoniak und Ammonium erfolgte zusammen als TAN (Total Ammonium Nitrogen), die von Nitrit, Nitrat und Phosphat jeweils getrennt mit Hilfe von kalibrierten kolorimetrischen Tests (Hach-Lange, Deutschland, Details siehe ¹²). Im zweiten Teil des Projekts wurden zusätzlich der biologische Sauerstoffbedarf (BSB₅) des Prozesswassers mit einem standardisierten Verfahren (5 Tage Inkubation bei 25°C in einem Thermostat) in einem BOD *Direct plus* (Hach, Deutschland) gemessen. Organische und anorganische Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen wurden mit Hilfe eines Elementanalysators (*multi N/C*[®] 3100, AnalytikJena, Deutschland) bestimmt. Die Proben wurden bis zu der Messung bei -18°C gelagert und vor der Analyse bei Raumtemperatur

¹² Waller et al, 2015 siehe Fußnote 11, Seite 8)

aufgetaut¹¹. Weitere Variablen (Temperatur, pH, Salzgehalt, Sauerstoffkonzentration, Oxidations-Reduktions-Potential) wurden täglich gemessen und protokolliert oder automatisch aufgezeichnet.

Probennahme für molekulargenetische Untersuchungen

In den Jahren 2015 und 2016 wurden an neun Stellen des kommerziellen RAS der *Fresh Völklingen* Fischzucht (Abbildung 2) Wasserproben (ca. 45 ml/Probe) gesammelt:

Entnahmestellen im Hauptkreislauf:

- Einlauf Produktionsbecken (Position 7)
- Auslauf Produktionsbecken (Position 1)
- Auslauf Trommelfilter1 (Position 2)
- Auslauf Nitrifikation (Position 6)

Nebenkreisläufe:

- Zulauf Flotation = Auslauf Trommelfilter 1 (Position 2)
- Auslauf Flotation (Position 5)
- Zulauf Denitrifikation (Position 8)
- Auslauf Denitrifikation (Position 9)

Feststoffentnahme:

- Feststoffsammelrinne Trommelfilter 1 (Position 3)
- Kondensat aus Flotation (Position 5)

Des Weiteren wurden Biofilmträger (Kaldnes K3) für molekulargenetische Untersuchungen entnommen. Aufgrund der Erkenntnisse aus der 1. Langzeitstudie wurde die Zahl der Stellen zur Probenentnahme in der 2. Langzeitstudie auf 5 begrenzt. Alle Wasser- und Biofilmproben wurden innerhalb von 3 Stunden nach Entnahme in einer Gefriertruhe (-18°C) eingefroren und dort bis zur Überführung in eine Tiefkühltruhe (-80°C) gelagert.

Zur Untersuchung der Bakterienflora der Fische wurden Abstriche von der Schleimhaut und von drei Stellen des Darmepithels (Vor-, Mittel- und Enddarm) präpariert. Zusätzlich wurden Kotproben der frisch geschlachteten Tiere eingefroren und analysiert. Untersucht wurden nur gesunde, äußerlich und innerlich symptomlose Tiere.

Molekulargenetische Untersuchungen

Die Mikrobiomanalysen wurden von der Firma SeqIT (Kaiserslautern, Deutschland) mit einer ultra-tiefen Sequenzierung des Gens der 16S rRNA, auch 16S Metagenomics genannt, analysiert¹³. Um die Biofilme von den Trägermaterialien zu isolieren, wurden sie einer 5-minütigen Beschallung im Ultraschallbad unterzogen. Die bakterielle DNA wurde mit Hilfe etablierter Verfahren extrahiert. Die hypervariable Region V3/4 der 16S rRNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) in 25 Zyklen amplifiziert (Primer-annealing bei 53°C). Die hochdegenerierten Primer 341F und 805R¹⁴ waren mit Barcode i5/i7 Indices modifiziert, sodass die PCR-Produkte nach Reinigung und Quantifizierung direkt in die ultra-tiefe Sequenzierung eingesetzt werden konnten. Die Sequenzierung erfolgte mit einem Illumina-Sequencer (Mi-Seq Desktop)¹⁵. Die mit diesem Verfahren gewonnenen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Burrows-Wheeler-Aligners¹⁶ mit Sequenzen von 16S rRNA Genen in der Datenbank SILVA¹⁷ verglichen. Der einer Sequenz zugeordnete Bakterienname wird „operationelle taxonomische Einheit“ (OTU) genannt. Zur Verbesserung der Übersicht wurden OTUs zu taxonomischen Gruppen (Art, Gattung, Ordnung, Klasse, Stamm) zusammengefasst. Die Häufigkeit eines OTU oder einer bestimmten taxonomischen Gruppe in % aller identifizierten Sequenzen diente als Merkmal der Bakteriengemeinschaft in der untersuchten Wasser- oder Biofilmprobe.

Statistische Auswertung der Ergebnisse

Da diese Methode in jeder Probe zehntausende OTU erfasste, wurden die Proben mittels statistischer Verfahren verglichen. Um die Bakteriengemeinschaften verschiedener Wasserprobe anhand ihrer Merkmale (Anteil bestimmter OTU oder taxonomischer Gruppen) zu vergleichen oder die Häufigkeit einzelner OTU oder bestimmter taxonomischer Gruppen mit an-

¹³ Wikipedia, siehe Fußnote 7 Seite 5

¹⁴ Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D (May 2007). "A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria". *Journal of Microbiological Methods*. **69** (2): 330–9. doi:10.1016/j.mimet.2007.02.005. PMC 2562909. PMID 17391789.

¹⁵ Wikipedia (engl.) „Illumina dye sequencing“

¹⁶ Li H, Durbin R (2009). "Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler Transform". *Bioinformatics*. **25** (14): 1754–1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324. PMC 2705234. PMID 19451168.

¹⁷ Elmar Pruesse, Christian Quast, Katrin Knittel, Bernhard M. Fuchs, Wolfgang Ludwig, Jörg Peplies, Frank Oliver Glöckner (2007) *Nucleic Acids Res.* SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. December; 35(21): 7188–7196.

deren Prozessvariablen zu korrelieren, wurden hierarchische und nicht-hierarchische Clusteranalysen, die Bray-Curtis Analyse und Korrelationsanalysen in den Programmen R und Origin benutzt.

2.3. Ergebnisse

2.3.1. Entwicklung von Wasserqualität und Mikrobiom im mit *Sparus aurata* besetzten RAS1 einer kommerziellen Fischzucht

In den Arbeitspaketen 1 und 2 wurde Wasser- und Biofilmproben aus dem kommerziellen RAS1 untersucht, das zwischen 2013 und 2014 mit annähernd 350.000 Jungfischen (Fingerlingen) der Art *S. aurata* besetzt worden war. Der Fischverkauf begann etwa 1 Jahr nach dem Erstbesatz. Er verlief so schleppend, dass bis 2016 kein weiterer Besatz erfolgte. Aufgrund des Wachstums der vorhandenen Tiere entwickelte sich 2015 ein Überbesatz. Die Überlast an Schmutz verursachte technische Probleme und verringerte den Wasserdurchsatz durch die Filter. Durch die zunehmende Verweilzeit des Wassers im Produktionsbecken verschlechterte sich Wasserqualität. Einzelne Fische erkrankten und starben. Um die Wasseraufbereitung zu entlasten, wurde weniger gefüttert.

Chemische Wasserqualität

Die Untersuchungen begannen knapp 2 Jahre (748 Tage) nach dem Erstbesatz. Abbildung 1 zeigt Merkmale der chemischen Wasserqualität, die durch die Ausscheidungen der Fische und die Aktivitäten der integrierten Biofilter für Nitrifikation und Denitrifikation (TAN, Nitrit-N, Nitrat-N) beeinflusst wurden. Während die Konzentrationen von TAN und Nitrit-N durch die Bakterien im nitrifizierenden Biofilter trotz erhöhter Verweilzeit des Wassers im Produktionsbecken auf niedrigem Niveau (< 1 mg/l Stickstoff) gehalten werden konnten, stieg die Konzentration des Nitrat-Stickstoffs (Nitrat-N) von 100 auf über 300 mg/l an. Durch Messungen der Nitratkonzentration im denitrifizierenden Biofilter (Deni, rote Symbole in Abbildung 4) wurde am Betriebstag 819 nachgewiesen, dass im Biofilter kein nennenswerter Nitratabbau und damit auch keine Denitrifikation stattfand. Versuche, durch Änderungen im Betriebsablauf den Nitratabbau zu aktivieren, führten am Tag 868 zum Erfolg. Die Nitratkonzentration im RAS 1, das mit Doraden besetzt war, konnte dadurch dauerhaft unter 100 mg/l Nitrat-N gesenkt werden (J.C. Tjong, persönliche Mitteilung)

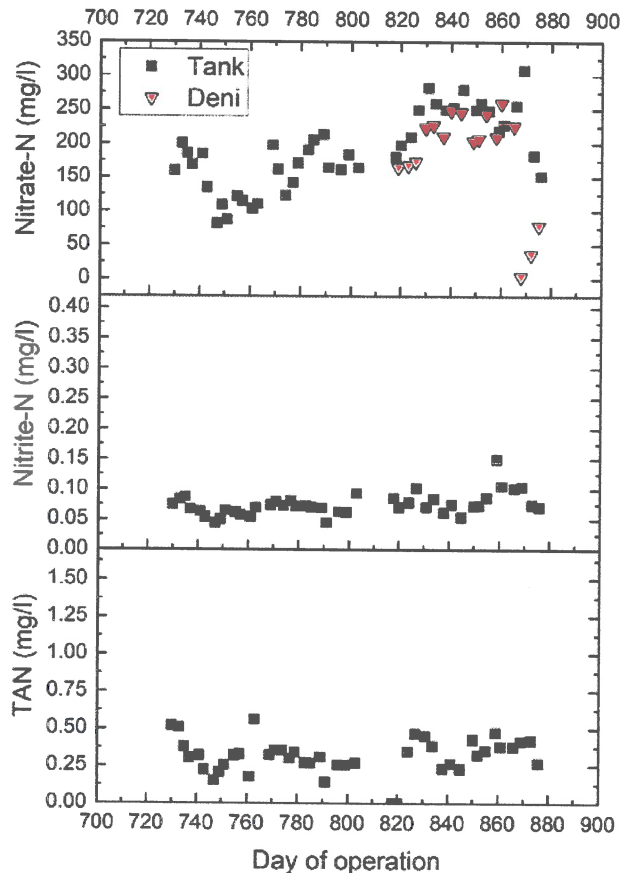


Abbildung 4: Gelöste Reststoffe im Fischtank der RAS1. TAN (Total Ammonium Nitrogen) ist ein giftiges Endprodukt aus dem Eiweißabbau der Fische, Nitrit ist ein bakteriell erzeugtes, für Fische giftiges Zwischenprodukt im natürlichen Stickstoffkreislauf. Nitrat ist das Produkt der bakteriellen Oxidation von TAN und Nitrit. Konzentrationen unter 100 mg/l Nitrat-N werden von vielen Fischen toleriert. Nitrat sollte im denitrifizierenden Biofilter (Deni, rote Symbole) abgebaut und in Luftstickstoff umgewandelt werden. Der Denitrifikationsprozess entwickelte sich erst nach einer Anpassung der automatischen Prozessführung (Tag 868). Der danach gemessene Anstieg des Nitrats im denitrifizierenden Biofilter (Deni) zeigt, dass der bakterielle Abbau von Nitrat auch nach der Korrektur instabil blieb. Die Nitratkonzentrationen blieben aber typisch unterhalb 100 mg/l.

Fischgesundheit

Ca. zwei Wochen vor Beginn der Untersuchungen war es im RAS zu einem großen Fischsterben gekommen (Abbildung 5, Daten vom Betreiber der Anlage). Der Amtstierarzt hatte eine *Flavobakteriose*¹⁸ (Loch und Faisal, 2015) diagnostiziert. Im Untersuchungszeitraum kam es noch einmal zu einer deutlich erhöhten Mortalität, meist bewegte sie sich jedoch bei ca. 700 Tiere pro Woche. Nach dem Verkauf der Anlage und notwendigen Reparaturarbeiten konnte dieser Wert halbiert werden. Um zu sehen, wie sich diese Entwicklung auf die Zusammensetzung des Mikrobioms auswirkte, wurden zehn Monate nach dem Verkauf noch einmal Wasser- und Biofilmpollen in wöchentlichen Abstand analysiert.

¹⁸ Loch TP, Faisal M (2015) Emerging flavobacterial infections in fish: A review. J Adv Res 6:283–300. doi: 10.1016/j.jare.2014.10.009

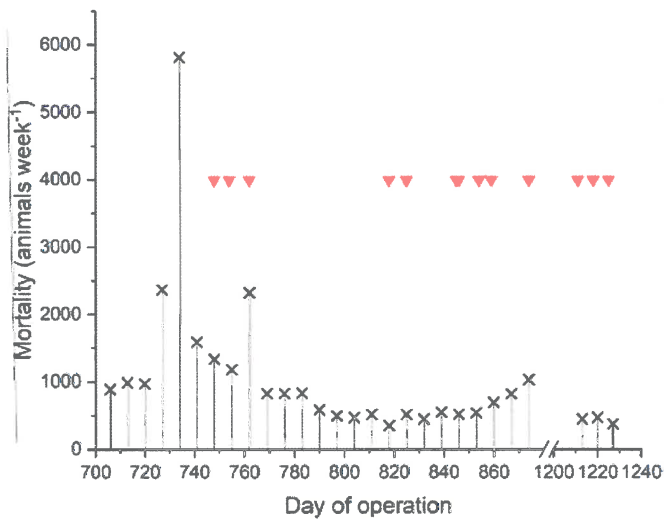


Abbildung 5: Anzahl toter Fische (*Sparus aurata*) die wöchentlich aus dem RAS1 entfernt wurden (Fische, die zum Zweck der Vermarktung gefangen wurden, sind hier zur Wahrung der betrieblichen Interna nicht berücksichtigt).

An den mit einem roten Punkt markierten Tagen wurden an neun Stellen im RAS Wasser- und Biofilm-Proben für die Mikrobiom-Analyse entnommen.

Das Mikrobiom eines kommerziellen RAS in Völklingen

Um ein RAS langfristig stabil zu betreiben, muss alles, was in Form von Futter und Sauerstoff für die Fische eingebracht wird, auch wieder entnommen werden. Der Produktionszweck ist die Entnahme von verkaufsreifen Fischen. Ein weiterer Entnahmeweg ist die bakterielle Remineralisierung von Reststoffen zu gasförmigen Produkten (CO_2 und N_2), welche das RAS durch Ausgasen verlassen können. Entfernt werden muss jedoch auch der ständige Zuwachs der Bakterien, die sich von den Fischausscheidungen im Produktionsbecken und in den Biofiltern ernähren und vermehren (Bakterienquellen). Im untersuchten RAS werden Partikel einschließlich Bakterien mittels Trommelfilter und Flotationsapparat entfernt. Diese Apparate werden im Folgenden als (Bakterien-)Senken bezeichnet. Um die Wirkung von Quellen und Senken auf die Zusammensetzung des Mikrobioms zu untersuchen, wurden im RAS an neun Stellen Wasser- bzw. Biofilmproben entnommen und mit Hilfe des Illumina-Sequencing-Verfahrens analysiert.

Die ursprüngliche Planung sah u.a. vor, die Zahl der Proben im Rahmen eines ersten Arbeitspakets (AP1) zu reduzieren. Durch die Verzögerung bei der Projektgenehmigung konnte das Arbeitspaket jedoch nicht wie geplant durchgeführt werden. Die zu diesem Teil gehörenden Ergebnisse werden im folgenden mitbehandelt.

Die Ergebnisse von 152 Mikrobiomanalysen zeigten eine außerordentlich hohe Diversität und Dynamik der Bakterien des RAS. Ein Vergleich der Proben mit Bray-Curtis und K-means

Custer-Analyse-Methoden zeigte, dass an 9 Tagen, an denen Proben für NGS entnommen wurden, diejenigen vier, die aus dem Hauptkreislauf entnommen wurden, eine ähnliche Zusammensetzung aufwiesen. An den anderen 5 Tagen wiesen diese 4 Proben jedoch größere Unterschiede auf, so dass eine Reduzierung der Entnahmestellen nicht angemessen erschien. Entnahmestellen mit erhöhter Bakteriendichte (Biofilter, Feststoffsammelrinne der Trommelfilter, Schaum der Flotation) wiesen dagegen immer abweichende Zusammensetzungen auf.

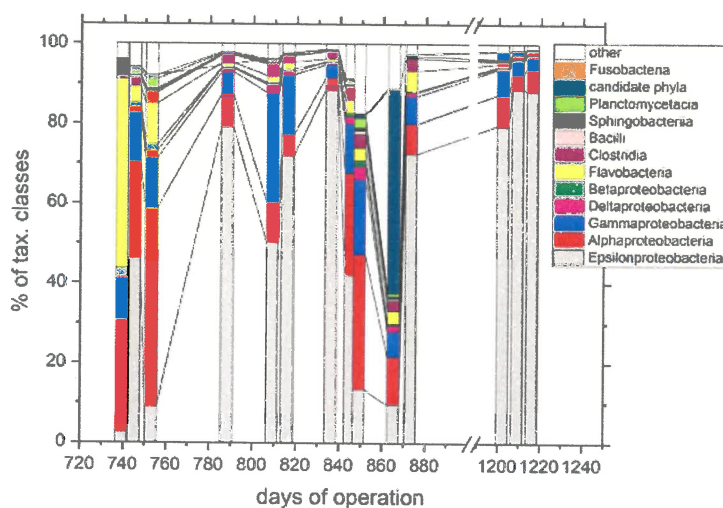


Abbildung 6: Anteile verschiedener taxonomischer Klassen von Bakterien im gesäuberten Wasser am Einlauf zum Fischbecken.

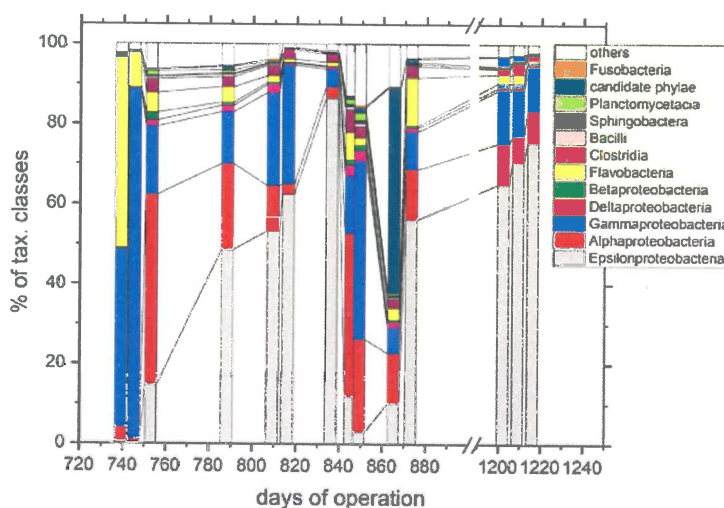


Abbildung 7: Anteile verschiedener taxonomischer Klassen von Bakterien im durch fischausscheidungen verunreinigten Wasser im Auslauf des Fischbeckens.

Im Beobachtungszeitraum veränderte sich die Zusammensetzung des Mikrobioms im Produktionsbecken des RAS mehrmals. In den Abbildungen 6 - 8 werden diese zeitabhängigen Veränderungen an vier Positionen im RAS verdeutlicht. Zur Vereinfachung der Darstellung wurden die OTU in taxonomische Klassen zusammengefasst. Ein Vergleich der Häufigkeit

verschiedener Bakterienklassen in Wasserproben, die an zwei Stellen im Hauptkreislauf entnommen wurden, nämlich am Einlauf (Ausgang der Wasseraufbereitung, gesäubertes aber nicht sterilisiertes Wasser, Abbildung 6) und Auslauf des Produktionsbeckens (Abbildung 7) zeigt, dass sich die Zusammensetzung während des Aufenthalts im Produktionsbecken häufig nur graduell veränderte. Bakterien finden Nahrung im Darm und der schleimigen Haut der Fische, die bereits bis zu zwei Jahre im RAS verweilten und in den festen und gelösten Ausscheidungen dieser Tiere. Hautabstriche von Fischen des RAS zeigten, dass in der Schleimschicht vorwiegend (>95%) Gammaproteobakterien siedelten. Auch der Fischkot wies einen großen Anteil Gammaproteobakterien auf. Bakterien, die solche Nährstoffquellen nutzen, können sich besser vermehren, als diejenigen, die frei im relativ nährstoffarmen Wasser treiben. Es ist deshalb nicht überraschend, dass vor allem der Anteil der Gammaproteobakterien (blau) im Produktionsbecken (Vergleich von Abbildung 6 und Abbildung 7) zunahm. Sie waren jedoch nicht die einzigen, die Nährstoffquellen im Produktionsbecken fanden.

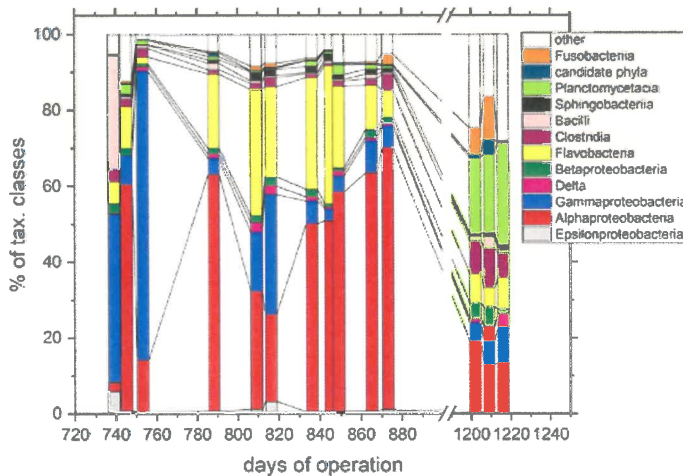


Abbildung 8: Taxonomische Klassen in der Feststoffsammelrinne des Trommelfilters, in der Bakterienschlamm abgeführt wird

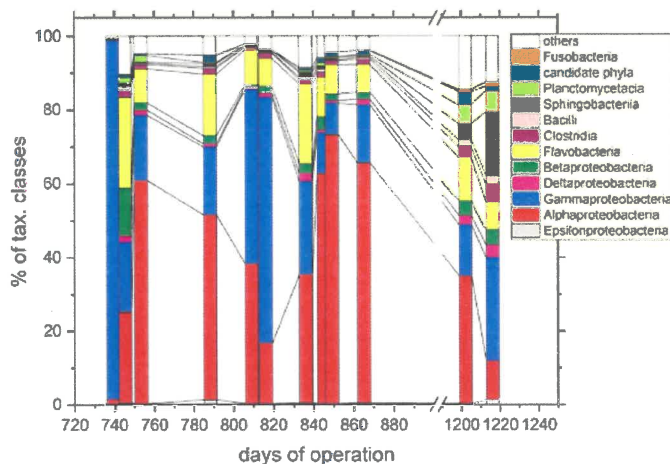


Abbildung 9: Taxonomische Klassen im abgeschiedenen Schaum des Flotationsapparats.

Abbildung 8 und Abbildung 9 zeigen die Zusammensetzung der Bakterien, die an den entsprechenden Tagen von Trommelfilter und Flotationsapparat aus dem RAS entfernt wurden. Auffällig ist, dass sich unter den mit diesen Apparaten entfernten Bakterien vor allem Alpha- und Gammaproteobakterien (rot und blau), sowie Flavobakterien (gelb) befanden, jedoch vergleichsweise wenige Epsilonproteobakterien (grau). Wegen dieser Selektivität der Filter erhöhte sich der relative Anteil der Epsilonproteobakterien in der Wasseraufbereitung (zwischen dem Eingang (Abbildung 7) und Ausgang (Abbildung 6), obwohl davon ausgegangen werden kann, dass sich Konzentration aller Bakterien in der Wasseraufbereitung verringerte. An 6 Untersuchungstagen enthielt das Wasser, das die Wasseraufbereitung verlies (Abbildung 6), immer noch sehr hohe Anteile von Alpha-, Gammaproteobakterien und Flavobakterien. Die Analyse der Primärdaten (OTU) zeigte, dass zum Beispiel der Anteil eines unbekanntes, den Flavobakterien zugeordneten OTU (U85888) am Tag 748 19% aller OTU im Zustrom und 24% aller das Produktionsbecken verlassenden OTU ausmachte. In den durch Trommelfilter und Flotation abgeschiedenen Bakterien war sein Anteil dagegen geringer als 1%. Trotz der vergleichsweise geringen Entnahme war der Anteil dieses OTU am Auslauf des Produktionsbeckens eine Woche später nur noch 4% und fiel in den folgenden Wochen und Monaten auf weit unter 1%. In diesem Fall muss von einer Quelle im Produktionsbecken ausgegangen werden, die im Verlauf der Untersuchungen versiegte.

Gegen Ende des 2. Betriebsjahrs wurden noch dreimal Proben im Abstand von je 1 Woche entnommen, um festzustellen, wie sich das Mikrobiom aufgrund der technischen Nachrüstung nach dem Verkauf der Anlagen entwickelt hatte. In den Proben aus dem Hauptkreislauf (Abbildung 6, Abbildung 7) dominierten Epsilonproteobakterien. Im Produktionsbecken erhöhte sich der Anteil von Alpha- und Gammaproteobakterien geringfügig. Unter den im Trommelfilter 1 abgeschiedenen Feststoffen (Abbildung 8) befanden sich nun größere Anteile von Planctomycetaria, Fusobacteria und Clostridia. Diese Klassen waren 10 Monate zuvor noch relativ selten. Zudem hatte die Zahl der OTU, die in zuvor ganz unbedeutenden Klassen („others“) zusammengefasst worden waren, deutlich zugenommen. Die Zunahme der Diversität nach Stabilisierung des Betriebs war auch unter den im Flotationsapparat abgeschiedenen OTU (Abbildung 9) erkennbar.

Taxonomische Klassen können Bakterienarten enthalten, die bei geschwächten oder verletzten Tieren Krankheiten hervorrufen und zum Tode führen. Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit einzelner OTU (oder taxonomischer Gruppen) und der

Zahl natürlich verstorbenen Fische (Abbildung 2) bestand, wurden zahlreiche Korrelationsanalysen durchgeführt. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen diesen Variablen (siehe auch Abschnitt 5).

2.3.2. Fischwachstum, Systemleistung und Mikrobiom in einem hochautomatisierten, experimentellen RAS

Um den Effekt des Prozessablaufs und des Fischbesatzes auf das Mikrobiom eines RAS besser zu beurteilen, wurde die 2. Langzeitstudie (AP3 des TP 4) am RAS der htw saar durchgeführt. Das RAS war nach einem 5-wöchigen Leerbetrieb mit 1.520 kleinen Wolfsbarschen (*Dicentrarchus labrax*) besetzt worden, die die Eingangsphase der Fresh Völklingen erfolgreich durchlaufen hatten.

Fischgesundheit

Die Fische wuchsen in 300 Tagen von einem Anfangsgewicht von $3,40 \pm 0,78$ g/Tier zu einem Gewicht von $291,4 \pm 49,3$ g/Tier heran (Abb. 4). Das war etwas schneller als die von Lupatsch et al.¹⁹ beschriebene Population von *D. labrax* (Sollkurve, Abb. 10). Ab einer Besatzdichte von 40 kg/m^3 wurde die Fischbiomasse konstant gehalten, indem regelmäßig Fische eingefangen und an die Fresh GmbH zurückgegeben wurden.

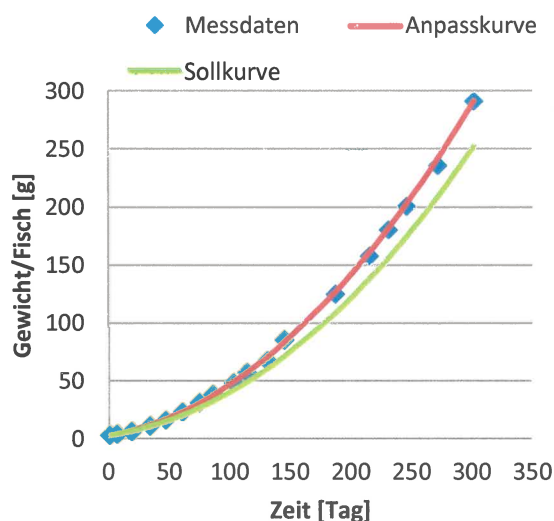


Abbildung 10: Wachstum von *Dicentrarchus labrax* in der RAS der htw saar. Für die Gewichtsbestimmung wurden die Fische mit Kescher gefangen und sofort mit Nelkenöl (Verdünnung 1:25.000) narkotisiert und gewogen. Nach Abklingen der Narkose wurden die Fische in das RAS zurückgesetzt.

¹⁹ Lupatsch I, Kissil GW, Sklan D (2001) Optimization of feeding regimes for European sea bass *Dicentrarchus labrax*: a factorial approach. *Aquaculture* 202:289–302. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00779-7

Trotz einer relativ hohen Wassertemperatur im Sommer (bis zu 28°C) war die Mortalität der Fische in diesem RAS durchgängig sehr gering (ca. 1 toter Fisch pro Woche).

Chemische Wasserqualität

Die von den Fischen und Bakterien beeinflussten Qualitätsmerkmale des Wassers (TAN, Nitrit-N und Nitrat-N sowie Phosphat) wurden dreimal wöchentlich gemessen (Abbildung 11). Bis auf wenige Ausnahmen blieb die Konzentration des von den Fischen ausgeschiedenen TAN deutlich unter der angestrebten Konzentration von 1 mg/l. Die Konzentration von Nitrit-N, einem Zwischenprodukt in der Nitrifikation, war jedoch kurz nach dem Fischbesatz deutlich erhöht (> 1,5 mg/l Nitrit-N). Dies wies darauf hin, dass im vorausgegangenen Leerbetrieb das Fehlen des von Fischen ausgeschiedenen Nährstoffs Ammonium (TAN) zu einem Verlust der nitrifizierenden Bakteriengemeinschaft im Biofilter 1 geführt hatte. Nach einer Woche hatte sich diese Gemeinschaft so weit entwickelt, dass die Konzentration von Nitrit-N dauerhaft unter 0,5 mg/l blieb.

Wie im zuvor untersuchten kommerziellen RAS1 der MFV reicherte sich Nitrat, ein Produkt des Biofilter 1, nach Produktionsbeginn im Prozesswasser an. Als Nitrat-N eine Konzentration von 100 mg/l erreicht hatte, die bei der Produktion von *D. labrax* nicht überschritten werden sollte²⁰, wurde ein zweiter Biofilter angeschlossen, in welchem Bakterien eine heterotrophe Denitrifikation (Umwandlung von Nitrat in N₂) mit Hilfe einer externen Kohlenstoffquelle durchführen sollten (Versuchstag 60). Jedoch schlugen alle Versuche fehl, eine stabile, heterotrophe Denitrifikation mit der Kohlenstoffquelle Glycerol, einem ungiftigen Abfallprodukt aus der Biodieselgewinnung, zu initiieren. Die Nitratkonzentration erhöhte sich weiter. Ab Versuchstag 80 wurde den Bakterien Acetat (Salz der Essigsäure) als Nährstoff angeboten. Mit diesem Nährstoff konnte der Nitratabbau induziert werden. Der Biofilter 2, der mit 3 x 30 Liter nur 1% des Gesamtvolumens der RAS umfasste, senkte die Nitratkonzentration im RAS effektiv (Abbildung 5), Details siehe Stavrakidis-Zachou et al, 2019²¹). Als die Nitrat-N-Konzentration im RAS nur noch 40 mg/l betrug, destabilisierte sich der Prozess aufgrund von Nitrat-Mangel im Biofilter 2. Wenn Nitrat fehlte, nutzten die Bakterien die Kohlenstoffquelle,

²⁰ Van Bussel et al., siehe Fußnote Seite

²¹ Orestis Stavrakidis, Anneliese Ernst, Christian Steinbach, Kai Wagner, Uwe Waller. Development of denitrification in semi-automated moving bed biofilm reactors operated in a marine recirculating aquaculture system. Aquaculture international, eingereicht am 30.11.2018.

um Sulfat zu reduzieren. Das Produkt dieser Reduktion, Schwefelwasserstoff (H_2S), ist hochgiftig für Mensch und Tier. Der Biofilter 2 musste vorübergehend aus dem Kreislaufsystem entfernt und gereinigt werden (Abbildung 11, Tag 140).

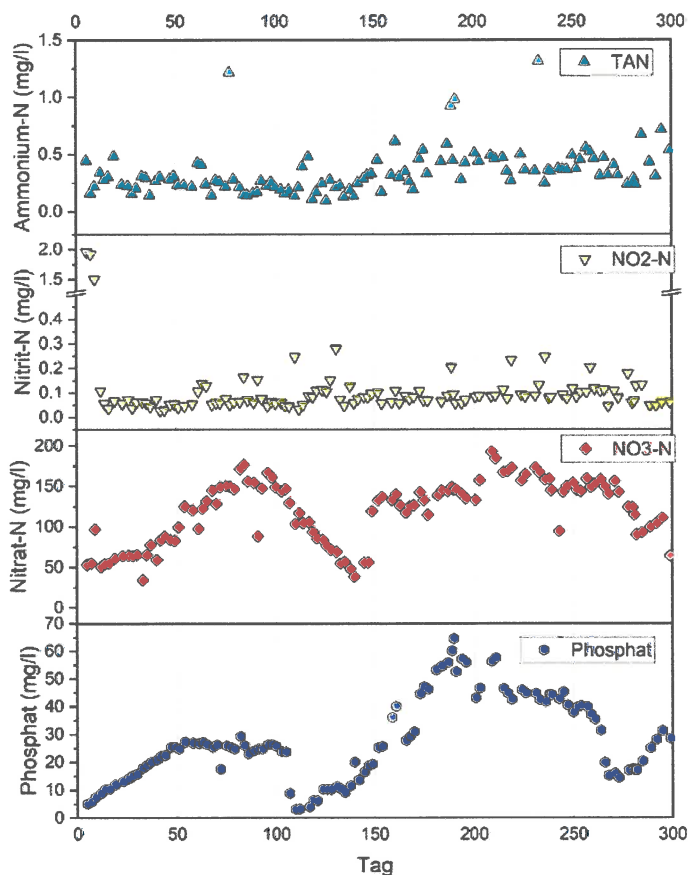


Abbildung 11: Gelöste Nährstoffe im experimentellen RAS.

Ausscheidungsprodukte der Fische (TAN = Total Ammonium-N (8A), und Phosphat (8D) sowie Nährstoffe, die durch bakterielle Umwandlung in den Biofiltern entstanden (Nitrit (8B) und Nitrat (8C)). Die fehlende Stabilität der Denitrifikation zeigte sich in den zeitweise sehr hohen Nitrat-Konzentrationen (8C). Aufgrund einer vermehrten CO_2 -Bildung während der Anlaufphase einer Denitrifikation kam es mehrmals zu einer leichten Ansäuerung des Prozesswassers der RAS, die automatisch durch Kalkzugabe neutralisiert wurde. Dies führte u.a. zu einer Ausfällung von Calciumphosphat, was sich in der deutlichen Abnahme des gelösten Phosphats widerspiegelte (8D).

Da die Nitratkonzentration im RAS bei steigender Futterlast ohne Biofilter 2 sehr schnell anstieg (Abbildung 11, nach Tag 145), wurde der Biofilter nach Entfernung eines Teils der Bakterienbiomasse wieder angeschlossen. Die danach im Biofilter 2 mittels automatischer Zufuhr von Nährstoffen (Prozesswasser und externe Kohlenstoffquelle) etablierte Bakteriengemeinschaft war deutlich weniger aktiv als die zuvor vorhandene Gemeinschaft, deren Nährstoffversorgung regelmäßig manuell überprüft und angepasst worden war. Zwar konnte mit der automatischen Versorgung die Nitratkonzentration stabilisiert werden, jedoch nicht im gewünschten Konzentrationsbereich von unter 100 mg/l Nitrat-N. Konstruktive Veränderungen am Biofilter 2, die aufgrund der Ergebnisse von MicStaTech im Rahmen des Projekts MARE durchgeführt wurden, verbesserten die Denitrifikationsleistung und führten schließlich zu einer merklichen Verringerung der Nitratkonzentration im RAS (Abbildung 11, nach Tag 250).

Bei Versuchen, die heterotrophe Denitrifikation im Biofilter 2 zu aktivieren, gelangten gelegentlich große Mengen von Bakterien aus dem Biofilter 2 in das RAS. Diese heterotrophen Bakterien produzierten im sauerstoffhaltigen Prozesswasser CO₂, das sich im Wasser zu Kohlensäure löste und den pH im RAS absenkte. Um den pH zu stabilisieren, wurde automatisch Kalkmilch (Ca (OH)₂) in das RAS gepumpt. Durch die Erhöhung der Calciumkonzentration kam es zwei Mal zu einer starken Trübung des Wassers. Diese Vorfälle wurden begleitet von einer drastischen Abnahme des im Prozesswasser gelösten Phosphats (Abbildung 11). Diese Abnahme beruhte auf der Ausfällung von Calciumphosphat. Die unlöslichen Calciumsalze (Carbonate und Phosphate) verminderten die Durchlässigkeit des Trommelfilters und reduzierten die Wasserzirkulation. Die Folge war eine Störung der Wasseraufbereitung durch Erhöhung der mittleren Verweilzeit des Wassers im Produktionsbecken. Durch manuelle Eingriffe in das automatisierte System konnte die mittlere Verweilzeit wieder auf 20 Minuten gesenkt werden.

Das Mikrobiom im experimentellen RAS

Bevor das experimentelle RAS mit 1.520 kleinen *D. labrax*-Fingerlingen frisch besetzt wurde, zirkulierte das Prozesswasser, in welchem zuvor eine andere Fischart produziert wurde, 5 Wochen ohne Fischbesatz. Am Ende dieser Leerlaufphase dominierten im Prozesswasser mehrere OTU, die verschiedenen Alphaproteobakterien zugeordnet wurden (Abb. 6, OTU in verschiedenen Rottönen). Drei Wochen nach Fischbesatz hatten die ursprünglich häufigen Alphaproteobakterien-OTU nur noch einen kleinen Anteil an der nun von Gammaproteobakterien (OTU in Grün- und Blautönen) dominierten Gemeinschaft. Während im kommerziellen RAS, das bereits zwei Jahre mit Fischen besetzt war und offensichtlich auch schon vor Untersuchungsbeginn Phasen mit bakterieller Instabilität durchgemacht hatte, eine unübersichtlich große Anzahl von OTU dazu führte, dass die Darstellung in den Abbildungen 6 – 9 eine Zusammenfassung der OTU in taxonomischen Klassen erforderlich machte, war die Zahl der häufigsten OTU am Beginn eines Fischbesatzes überschaubar (Abbildung 12).

In einzelnen Proben wurden die sonst häufigen OTU jedoch verdrängt durch eine Vielzahl anderer, deren Anteil im Prozesswasser sonst unter 1% lag. Automatische und manuelle Aufzeichnungen deuteten nicht auf Prozessstörungen hin. Da Biofilmproben generell eine sehr viel höhere Diversität aufwiesen als Wasserproben, bestand der Verdacht, dass diese Proben zufällig (eine) abgeriebene Flocke(n) aus einem Biofilter enthielt. Aufgrund der dichten Packung der Bakterien in den Biofilmen würden diese Flocken die Zusammensetzung einer klaren Wasserprobe stark verändern.

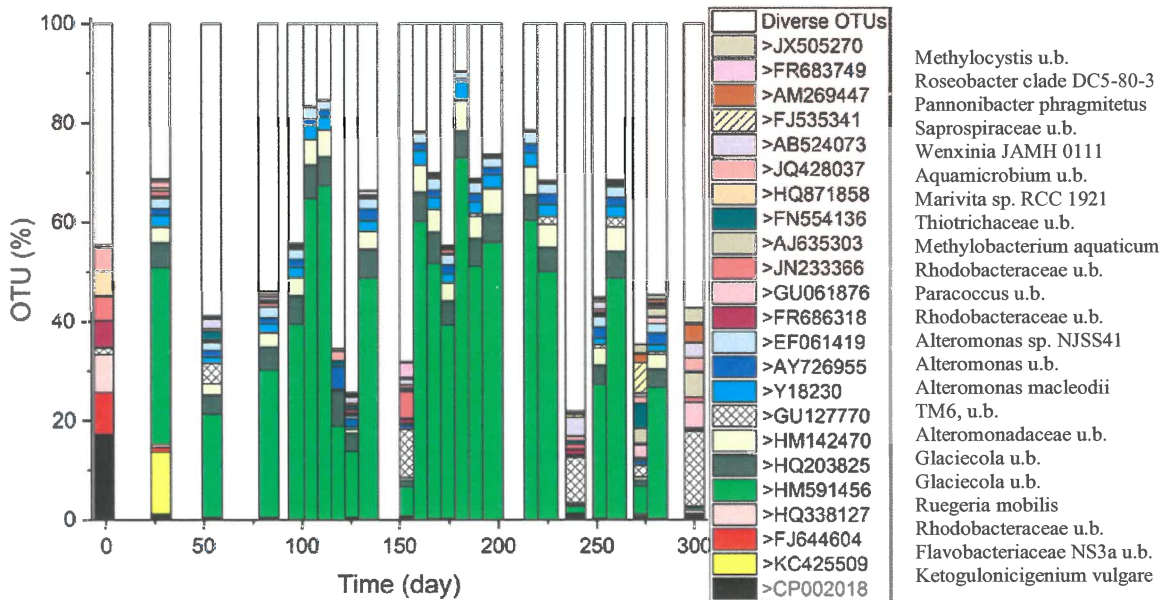


Abbildung 12: Die häufigsten OTU in Wasserproben aus dem Fischbecken. Alphaproteobakterien: Rottöne; Gammaproteobakterien: Grün- und Blautöne; u.b.: Bakterienart unbekannt (bisher nicht im Labor kultiviert). Die erste und die letzte Wasserprobe wurde aus dem RAS entnommen bevor Fische eingesetzt bzw. nachdem sie aus dem RAS entfernt worden waren.

In den fraglichen Proben gab es ein OTU mit auffällig hohem Anteil, das OTU GU127770. Bei der Suche nach der Quelle von GU127770 wurden wir an 2 Stellen fündig: in Ablagerungen im Verbindungsrohr zwischen Feststoffsammelrinne und Sedimentation und in Biofilmen aus dem Kohlendioxid-Entgaser, der 110 Tage nach Fischbesatz zur Abreicherung der von Bakterien aus der Denitrifikation zusätzlich eingebrachten Kohlendioxids eingebaut worden war. Dies unterstützte die oben geäußerte Vermutung, dass diese Wasserproben möglicherweise durch die Anwesenheit von Biofilmflocken verfälscht worden waren.

Bakterien in Darm und Kot von Fischen

Um zu klären, ob die Bakterien im Prozesswasser von den Ausscheidungen der Fische stammen, wurden die Därme von sieben Fischen präpariert (Abbildung 13). Epithelbakterien wurden im vorderen (1), mittleren (2) und hinteren (3) Sektor des Darmes abgestrichen. Ein Kotbällchen im Enddarm (4) wurde extra präpariert. Die Diversität der Bakterien in den Fischdärmen war deutlich größer als im Prozesswasser. Da einzelne OTU nur in wenigen Fällen eine Häufigkeit von mehr als 1% aufwiesen, wurden OTU zu taxonomischen Familien zusammengefasst (Abbildung 13). Das Epithel des Enddarms wurde bei allen 7 Fischen von

Mycoplasmataceae und Halomonadaceae sowie vielen anderen, jedoch weniger verbreiteten taxonomischen Familien besiedelt. In den Kotbällchen von 2 Fischen befand sich ein großer Anteil Spirochaeten, die bei diesen Fischen auch im ersten Darmabschnitt vorkamen (Abbildung 13, oben). Die Familie der Alteromonaden, zu welcher die im Prozesswasser häufige Gattung *Glaciecola* gehört, waren dagegen äußerst selten in der Darmflora der Fische. Die Ausscheidungen der Fische war demnach nicht die Quelle der *Glaciecola*-OTU's im Prozesswasser.

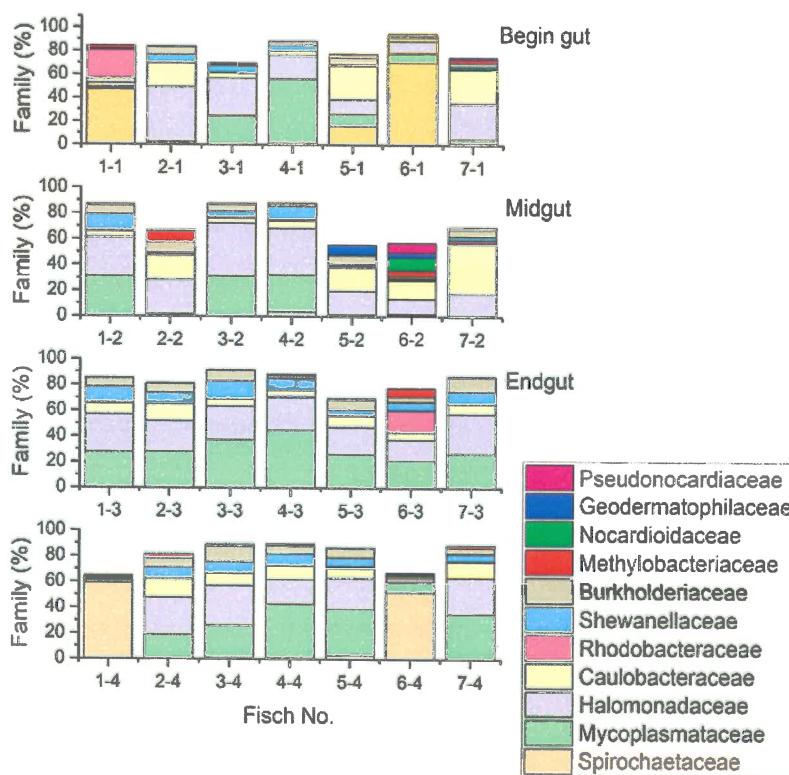


Abbildung 13: Taxonomische Familien in den Darmabschnitten 1 - 3 und im Kot (4) von 7 Fischen.

Zwölf der häufigsten OTU in Fischkot wurden als potentielle Marker für Fischkot ausgewählt. Die Summe dieser OTU im Kot betrug 28% – 71%. Im Prozesswasser wurden sie dagegen selten beobachtet (Anteil <0,04%). Nur in einer von 24 Wasserproben aus dem Produktionsbecken erreichten Mycoplasmen einen Anteil von 8%. Dieses Ergebnis kann als Beleg für eine sehr effiziente Entfernung von Fischkot aus dem Prozesswasser durch Trommelfilter und Flotation gewertet werden.

2.4. Diskussion

Die Meeresfischzucht Völklingen (MFV GmbH) war weltweit die erste kommerzielle Fischzucht, die ortsunabhängig und ohne direkten Zugang zum Meer marine Edelfische produzierte und ab dem 2. Betriebsjahr regional vermarktete. Der Fischverkauf erreichte jedoch nicht annähernd den für dieses Jahr geplanten Umfang von 200 Tonnen. Dies zwang den kommunalen Betreiber 2015 zum Verkauf der politisch hoch umstrittenen Anlage. Die Nachfolgerin, *Fresh Völklingen*, übernahm im August 2015 die Anlagen mit den aus dem Besatz von 2013 und 2014 noch vorhandenen Fischen.

Während der wirtschaftlichen Krise der MFV GmbH führten verschiedene Störungen in der Wasseraufbereitung, möglicherweise auch in der Behandlung der Fische (z.B. Reduzierung der Fütterungsrate, Rückwurf untermaßiger Fische) zu einer erhöhten (natürlichen) Mortalität von *Sparus aurata*. Die Nitratkonzentration ist eines von mehreren Wasserqualitätskriterien in der Fischzucht. Sie erhöhte sich im Untersuchungszeitraum aufgrund eines Versagens der Denitrifikation (Abbildung 4). Alleine konnte die erhöhte Nitratkonzentration jedoch nicht für den schlechten Zustand und Tod einzelner Fische verantwortlich gemacht werden. Die Mortalität beruhte offensichtlich auf dem Zusammentreffen mehrerer Faktoren. Welche diese waren, ließ sich in dem auf die Entnahme von Wasser- und Fischproben beschränkten Untersuchungsprogramm von MicStaTech nicht feststellen.

Auch die zweite Fischart, die wir untersuchten, *D. labrax*, musste häufig mit hohen Nitratkonzentrationen im Prozesswasser zurechtkommen (Abbildung 11). In diesem RAS wurde jedoch zu keiner Zeit eine Erhöhung der Mortalität beobachtet. Die Fütterung wurde mit Hilfe der von Lupatsch et al.²² publizierten Wachstumskurve dieser Fische täglich an den Zuwachs angepasst. Da sie jedoch insgesamt etwas schneller wuchsen, als die von Lupatsch et al. beobachteten Tiere, muss man annehmen, dass unsere Tiere trotz der hohen Nitratkonzentration eine bessere Futtermittelverwertung aufwiesen.

Durch die Untersuchung des Mikrobioms wurde erstmals gezeigt, dass die physikalischen Filtereinheiten in den von Professor Waller und Mitarbeitern entwickelten Kreislaufsystemen Bakterien bestimmter taxonomischer Klassen bevorzugt entfernen. Dabei ist anzunehmen, dass im Trommelfilter vor allem Bakterien, die auf größeren Partikeln (Biofilmbriebe, Fischkot und Schleimhautabriebe) siedeln, abgeschieden werden. Auch der Flotationsapparat wies eine Selektivität auf, die jedoch weiterer Untersuchung bedarf. Ebenfalls erstmalig wurde gezeigt, dass es aufgrund der Selektivität der Filtereinheiten zur Anreicherung von zur

²² Lupatsch et al. siehe Fußnote 19 Seite 18

Zeit noch unbekannten Bakterien kommt, die von diesen Filtern mit geringerer Effizienz entfernt werden. Im kommerziellen RAS1 handelte es sich um eine Vielzahl von unbekannten OTU, die der Klasse der Epsilonproteobakterien zugeordnet wurden. Im frisch mit Jungfischen besetzten experimentellen RAS waren es dagegen OTU aus der Klasse der Gamma-proteobakterien (Familie Alteromonaden, Gattung *Glaciecola*), die sich einer Entfernung durch Trommelfilter und Flotation entzogen. Da die relative Zunahme dieser OTU nicht primär auf Vermehrung beruhte, und das RAS mit einer sehr hohen Zirkulationsrate betrieben wurde, die eine mittlere Verweilzeit des Prozesswassers in den Komponenten des Hauptstroms von wenigen Minuten zur Folge hatte, konnte die Quelle dieser Bakterien nicht ausgemacht werden.

In Einzelfällen, wie dem OTU U85888, das am ersten Untersuchungstag des RAS1 der kommerziellen Fischzucht auffällig häufig im Hauptkreislauf des Prozesswassers vorkam, legten die relativen Häufigkeiten am Ein- und Ausgang des Produktionsbeckens eine Quelle im Produktionsbecken nahe. Ob dieses unbekanntes, taxonomisch zu den Flavobakterien gehörende Bakterium ursächlich mit der vorausgegangenen Fischmortalität (Abbildung 5) zu tun hatte, konnte jedoch nicht geklärt werden. Tatsache ist jedoch, dass es in keiner der später entnommenen Proben eine Häufigkeit von $> 1\%$ erreichte, was einen Zusammenhang zur zuvor erhöhten Mortalität wahrscheinlich macht.

Die Analysemethode NGS lässt keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Konzentration einzelner OTU im Wasser zu. Es ist deshalb denkbar, dass sich durch Mängel in der Wasseraufbereitung, die zu einer Erhöhung der Keimzahl im Wasser führen, also insbesondere die Erhöhung der Verweilzeit des Prozesswassers im Produktionsbecken, auch Krankheitserreger so vermehren, dass sie die Immunabwehr von geschwächten Fischen überwinden können, ohne dass sich ihr Anteil in den untersuchten Wasserproben auffällig erhöht.

Die Mikrobiomanalysen wurden den Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Die Zunahme der Diversität des Mikrobioms im kommerziellen RAS, das mehrere Jahre ohne Unterbrechung betrieben wurde, kann als Bestätigung des ökologischen Nischenmodells und der K-Selektion gewertet werden (Vadstein et al., 2014)²³. Allerdings hatte sich gezeigt, dass in den untersuchten RAS nicht alle Bakteriennährstoffe durch Aktivität und Konkurrenz zwischen den Bakterien niedrig gehalten werden konnten (Abbildung 4 und Abbildung 11). Insbesondere reicherte sich infolge einer unzureichenden Stabilität der Denitrifikation in beiden RAS

²³ Vadstein et al. siehe Fußnote 5 Seite.4.

Nitrat an. In intensiven Aquakultursystemen stellen erkrankte und tote Fische als Nahrungsquelle für gefährliche Bakterien eine besondere Gefahr für gesunde Fische dar. In einem intensiven Produktionssystem wird Stabilität deshalb primär durch Bakterien-entfernende Komponenten in der Wasseraufbereitung erreicht, die, wie in Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8 und Abbildung 9 gezeigt, jedoch nicht alle OTU und alle taxonomischen Klassen gleichmäßig entfernen, sondern selektiv wirken.

3. Vergleich der Ergebnisse und Nebenergebnisse zu den ursprünglichen Zielen und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

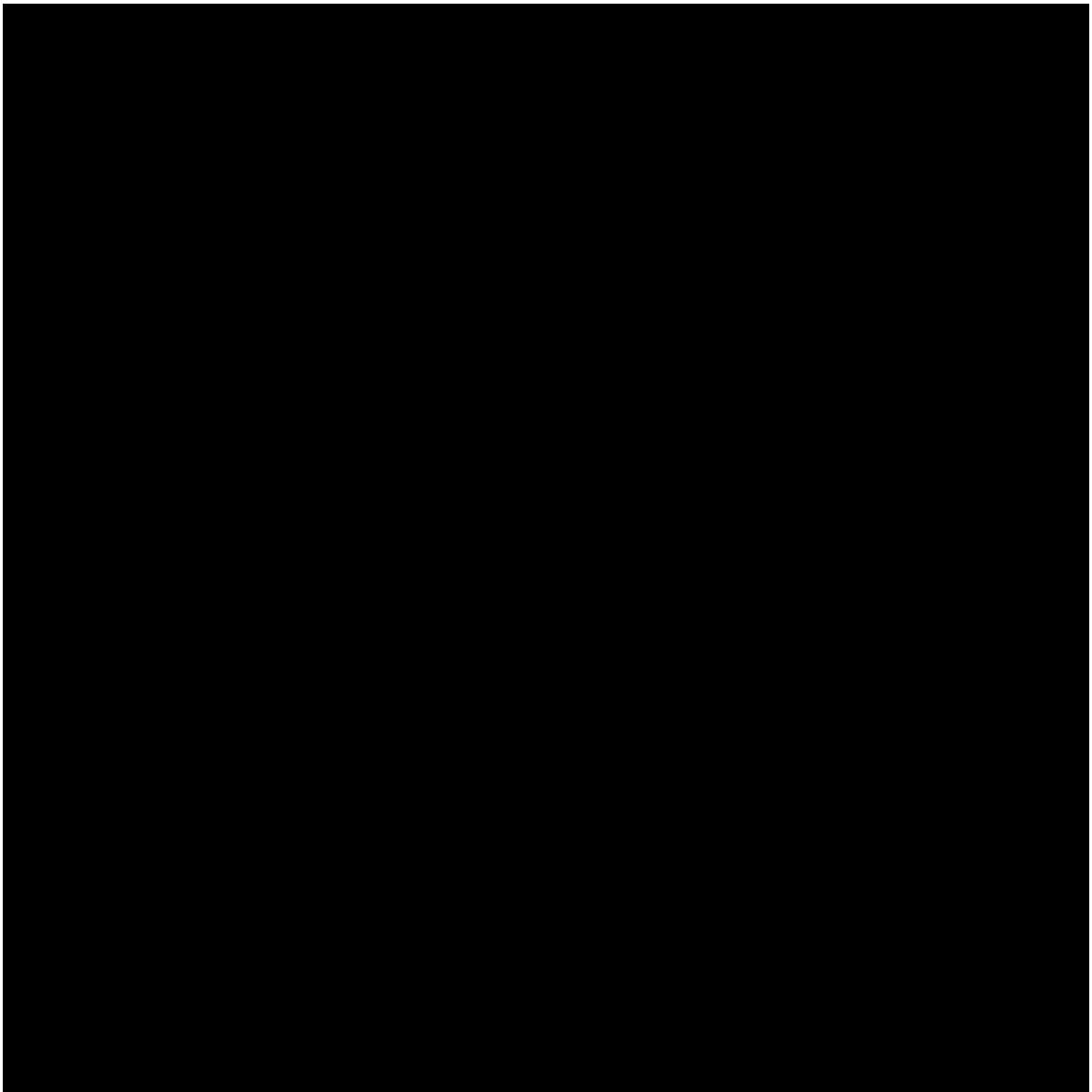
Das übergeordnete Ziel des Projekts MicStaTech war, zu zeigen, dass Fischgesundheit und Überlebensraten von Fischen in landbasierten Aquakultursystemen durch den Aufbau und Erhalt einer stabilen, diversifizierten Bakteriengemeinschaft verbessert werden. Die Hauptaufgabe von TP 4 bestand darin, mittels moderner Sequenzieretechniken zu bestimmen, wie stabil die Bakteriengemeinschaften unter realen Aquakulturbedingungen sind. Anhand der Untersuchungen am experimentellen RAS (Teil 2) wurde gezeigt, dass mit dem von Professor Waller und Mitarbeitern entwickelten Konzept des Klarwasser-RAS, das durch eine kurze Verweilzeit des Wassers im Produktionsbecken und an die Futterlast angepasste physikalischen und biologischen Filter charakterisiert ist, auch eine weitgehend stabile Bakteriengemeinschaft im Prozesswasser des RAS entsteht (Abbildung 12). Im kommerziellen RAS1 der MFV hatten wirtschaftliche Probleme bereits vor Untersuchungsbeginn zu einer Erhöhung der mittleren Verweilzeit des Prozesswassers im Produktionsbecken geführt. Es ist anzunehmen, dass dies nicht nur das Mikrobiom destabilisierte (Abbildungen 6 - 9), sondern auch zu einer Erhöhung der Fischmortalität führte (Abbildung 5). Dies soll nicht als Widerspruch zu der oben gemachten Aussage gewertet werden. Im Gegenteil, die mittels NGS und Wasserqualitätsanalysen erbrachten Ergebnisse verdeutlichen, wie wichtig eine stabile Wasseraufbereitung in intensiven Aquakulturen ist.

Ein Ziel, die Entwicklung eines auf NGS beruhenden, schnellen und von Kultivierung und Vorwissen um die Anwesenheit eines bestimmten Krankheitserregers unabhängigen Diagnoseverfahrens (AP 4) konnte nicht erreicht werden. Die Informationen über die Häufigkeit bestimmter OTU reichten nicht aus, um potentielle Krankheitserreger mittels Cluster- oder Korrelationsanalysen zu identifizieren.

Ein relevantes Nebenergebnis von MicStaTech ist ein neues Verfahren zur Stabilisierung einer heterotrophen Denitrifikation. Eine biologische Denitrifikation ist im RAS erforderlich,

um auf den vielerorts praktizierten täglichen Wasseraustausch zur Stabilisierung des Nitratgehalts im Prozesswasser verzichten zu können. Das Verfahren wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit von Prozess- und Automatisierungsingenieuren und Biologen in zwei mit Drittmitteln geförderten Projekten (MicStaTech und MARE) an der htw saar entwickelt. Das Verfahren wurde als Erfindung gemeldet (PVA Saarbrücken, Aktenkennzeichen 2018/44) und soll patentiert werden.

4. Darstellung und Erläuterung der Angemessenheit von Aufwand und Zeit



Letztlich konnte dieses Projekt, mit seiner real um 5 Monate gekürzten Laufzeit, nur deshalb erfolgreich zu Ende geführt werden, weil sich die Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des Projekts MARE für beide Seiten positiv entwickelte. Nach Projektende verzögerte sich jedoch die Auswertung der Ergebnisse, weil die ehemalige Projektleiterin mit anderen Aufgaben beauftragt wurde.

5. **Aufführen von Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben.**

Teilprojekt 4 sollte u.a. Daten für Teilprojekt 3 liefern, um die dort entwickelten Modelle zur Stabilisierung von Bakteriengemeinschaften zu validieren. Für dieses Projekt wurden Datensätze über die Häufigkeit von Bakterien in Biofilmen und Prozesswasser an die Projektpartner weitergegeben. Die Komplexität und Dynamik im Mikrobiom, die die eingesetzte Methode zur Erkennung von OTU (Bakterienarten) offenbarte, lies sich jedoch nur schwer mit den Dichte- und Aktivitäts-basierten Modellen zur bakteriellen Stabilisierung vereinbaren, die in den Teilprojekten 3 und 5 des internationalen Projekts MicStaTech erarbeitet worden waren. Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, dass die am häufigsten nachgewiesenen OTU keiner kultivierten und charakterisierten Bakterienspezies zugeordnet werden konnten. Es ist also unklar ob sie die vom Modell geforderten Eigenschaften besitzen.

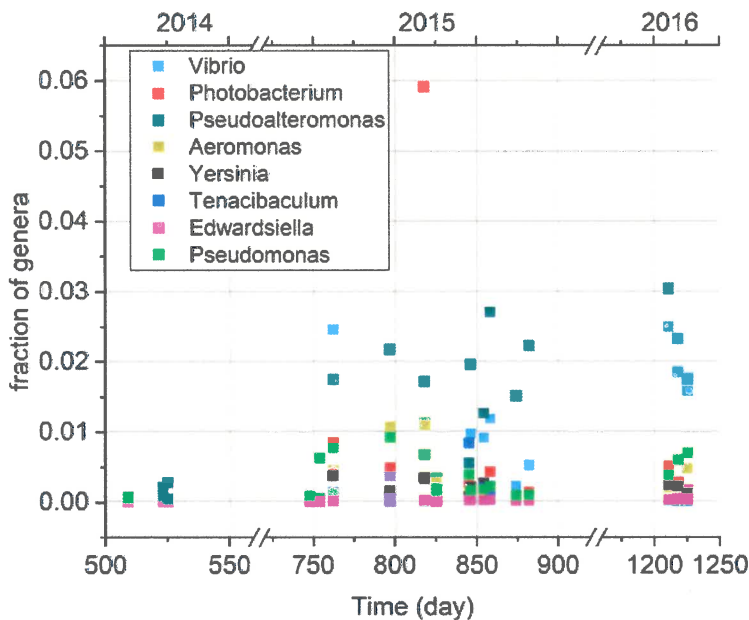


Abbildung 14: Genera, in welchen einzelne Bakterienspezies vorkommen, die Fischkrankheiten wie Columnaris, Schwanzfäule, oder Furuncularis auslösen. Die Signifikanz dieser Abbildung ist sehr begrenzt, da die Zuordnung der nachgewiesenen Sequenzen über einen Genabschnitt erfolgt, der keine Aussagekraft über die (aktuell transkribierte) Pathogenität der Träger erkennen lässt.

In Teilprojekt 4 war das Ziel formuliert, mit der molekulargenetischen Sequenzierungsmethode (NGS) ein schnelles, von Kultivierung und Vorwissen um die Anwesenheit eines bestimmten Pathogens unabhängiges Diagnoseverfahren für die Aquakultur zu entwickeln (in AP 4). Es ist bekannt, dass die für die molekularbiologischen Bestandsaufnahmen gewählte Zielsequenz in der V3-V4 Region des ribosomalen Operons keine Informationen über die an anderen Stellen im Genom kodierte Pathogenität enthält. Um die Anwesenheit von bekannten Fischpathogenen zu ermitteln, wurde eine umfangreiche Literatursuche durchgeführt. Dabei war eine tunesische Praktikantin sehr hilfreich, die über ihre ehemaligen Kollegen Zugang zu Spezialliteratur hatte, die weder über die Universität des Saarlandes noch über die htw saar kostenfrei beschafft werden konnte. Die aufgeführten Spezies wurden jedoch nur sporadisch in den Proben nachgewiesen. Selbst eine Ausweitung der Suche auf alle OTU, die der gleichen Gattung zugeordnet werden konnten (Abbildung 14), ergab keine Korrelation mit der Fischmortalität (Abbildung 5). Auch der Versuch, über Korrelationsanalysen mit der Fischmortalität potentielle Fischpathogene zu ermitteln, scheiterte. Dieses Ziel konnte deshalb nicht erreicht werden.

6. Darstellung und Erläuterung der wissenschaftlichen Anschlussfähigkeit für eine mögliche nächste Phase.

Trotz des unter Punkt 5 dargestellten Schwierigkeiten bei der Entwicklung einer kultivierungsunabhängigen Nachweismethode für Pathogene in der Aquakultur ist die Entwicklung eines auf NGS beruhenden Nachweisverfahrens, das von Kultivierung und Vorkenntnissen unabhängig ist, ein Weg, den die Diagnostik verfolgen sollte. Für die Testentwicklung sollten jedoch nicht Wasserproben oder Biofilme in einer Anlage, sondern gezielt Abstriche von erkrankten Tieren untersucht werden. Das Verfahren sollte in enger Zusammenarbeit mit einem Fachtierarzt für Fische entwickelt werden. Im Rahmen von MicStaTech wurde eine derartige Untersuchung mit Erfolg durchgeführt, d.h. mit der Identifizierung eines OTU, das einem Krankheitserreger zugeordnet wurde.

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

Die Ergebnisse konnten nur durch den Einsatz der Bundesmittel in einem gemeinsam von EU-Partnern bearbeiteten Projekt erzielt werden. Dies ist auch auf die besondere Situation

der Forschung an Hochschulen für angewandte Wissenschaften zurückzuführen, die über keinen Mittelbau in ihrer Personalstruktur verfügen. Die Hochschule kann nur in sehr begrenztem Umfang Sachmittel für die Forschung und Personalmittel für Mitarbeiter bereitstellen.

Die Professoren an Hochschulen für angewandte Wissenschaften haben einen speziellen Erfahrungshorizont durch die enge Zusammenarbeit mit der Wirtschaft, die eine zielführende Umsetzung von Methoden der grundlegenden Forschung, also einen unmittelbaren Wissenstransfer zulassen. Das Illumina Sequencing war nur durch die unmittelbare Zusammenarbeit mit der Wirtschaft möglich, da die Hochschule weder über ein entsprechendes Labor noch die notwendigen Apparate verfügt.

Grundlegende Forschungsarbeiten, wie die molekulargenetischen Arbeiten, die hier im Projekt MicStaTech durchgeführt wurden, erfordern zusätzliche, in den Spezialgebieten erfahrene Mitarbeiter. Die dafür erforderlichen Personalmittel können nur über Projektmittel eingebracht werden.

Das im Vergleich zu Universitäten sehr hohe Lehrdeputat behindert die Professoren an Hochschulen für angewandte Wissenschaften allerdings in der Arbeit in Forschung und Entwicklung, sodass Forschung und Entwicklung oft nur durch Mitarbeiter, die im Rahmen eines Forschungsprojektes eingestellt werden, möglich wird. Im deutschen Teilprojekt von MicStaTech hatte die Projektleiterin selbst keine feste Stelle an der Hochschule. Sie wurde mit genehmigten Personalmittel aus dem Projekt eingestellt.

8. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer – z. B. Anwenderkonferenzen (soweit die Art des Vorhabens dies zulässt) und Darstellung der erfolgten und geplanten Veröffentlichungen der Ergebnisse.

Dissemination über Veranstaltungen

Die Ergebnisse des Projekts MicStaTech werden im Rahmen von wissenschaftlicher Zusammenarbeit, Seminaren und Vorlesungen an Universitäten für grundlegende und angewandte Wissenschaft an relevante Gruppen weitergegeben. Dazu gehören zum Beispiel das Fraunhofer IPT, Aachen, das University College Cork, Ireland, die Danish Technical University, Kopenhagen, die Norwegian Technical University, Trondheim, das CCMAR, Universidade Algarve, Portugal und die California State Polytechnic University, Pomona, California, USA.

Studierende der Universität Konstanz profitiert von den Ergebnissen über Wahlpflichtveranstaltungen, welche die Projektleiterin als Privatdozentin dieser Universität regelmäßig veranstaltet.

Veröffentlichungen

Anneliese Ernst, Verena Hanke, Patrick Maurer, Uwe Waller. Microbial inventory and fish survival in a commercial recirculating aquaculture system during an entrepreneurial crisis. *Frontiers of Microbiology*, in Vorbereitung.

Orestis Stavrakidis, Anneliese Ernst, Christian Steinbach, Kai Wagner, Uwe Waller. Development of denitrification in semi-automated moving bed biofilm reactors operated in a marine recirculating aquaculture system. *Aquaculture international*, eingereicht am 30.11.2018.

Kai Wagner, Anneliese Ernst, Benedikt Faupel, Christian Steinbach, Uwe Waller. Smart integration enables effective stabilization of denitrification in recirculating aquaculture system. *Aquacultural engineering*, (Veröffentlichung zurückgestellt wegen Patentmeldung)

Anneliese Ernst, Patrick Maurer, Uwe Waller. Bacteria of intestine epithelium and feces as markers for bacterial water quality in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture international*, in preparation.

Anhang 1, 2815ERA02G MicStaTech
 Laufzeit: 1.4.2015 bis 30.4.2018
 Tabellarische Übersicht

Teilprojekt 4

Work pack Aufgaben		Vorgesehener Zeitraum	Abschlussber.	Kommentar
AP 4.1	Methodische Fragen	1.4.15 bis 31.6.15	Seite 6	Da keine Projektgenehmigung vorlag, wurde der Mitarbeiter nicht eingestellt [†]
AP 4.2	RAS1, kommerziell	1.7.15 bis 30.9.16	Seite 12 -18	
	Wasseranalysen		Seite 12	Probennahme und Analysen 1.4.2015 bis 31.7.2015**
	Fischgesundheit		Seite 13	Daten über natürliche Mortalität vom Betreiber der Anlage
	Bakteriengemeinschaft RAS 1		Seite 14 -18	Probennahme 1.4.2015 bis 20.7.16, Analysen bis Aug. 2016
	Bakterien in u. auf S.aurata		Seite 16	
AP 4.3	RAS2, Species 2, D. labrax	1.10.16 bis 31.9.17	Seiten 18 -23	
	Wasseranalysen		19 -21	Probennahme und Analysen 1.2.16 bis 15.3.17*** zusätzliche Aufgabe: Stabilisierung der Denitrifikation
	Fischgesundheit		Seite 18	Wachstum 18.2.16 bis 17.12.16
	Bakteriengemeinschaft RAS der htw saar		Seite 21 -23	Probennahmen 1.2.2016, bis 17.12.16. Analysen bis 12.2017
	Bakterien in D. labrax		Seite 22 -23	2016
AP 4.4	Evaluierung und Report	1.8.15 bis 31.3.18		Nach Projektverlängerung: Evaluierung und Report bis 30.4.2018

Erklärungen für Abweichungen vom ursprünglichen Plan:

*Zuwendungsbescheid vom 13.7.2015

** 1.4.15. Förderunschädlicher Vorhabensbeginn, Mitarbeiter stundenweise von htw saar für Projekt freigestellt

Forschungskooperation bestand mit MFV; nach Besitzerwechsel (1.8.2015) kam kein Kooperationsvertrag zustande

*** Betrieb der experimentellen RAS wurde von der htw saar über Drittmittel finanziert, die nur eine begrenzte Betriebszeit zuließen

Eine Stabilisierung der bakteriellen Denitrifikation wurde erforderlich, nachdem festgestellt wurde,

dass diese sowohl in der kommerziellen als auch in der experimentellen RAS instabil war

Der Beitrag von MicStaTech am Betrieb der RAS der htw saar: Wasseranalytik, Mikrobiomstudien

Wochenenddienste, konstruktive Arbeiten (C. Steinbach)