

## Kurzfassung

Deutschland importiert einen großen Teil der für industrielle Verarbeitung und Versorgung der Bevölkerung benötigten Erzeugnisse aus Fischerei und Aquakultur. Um einen höheren Grad von Selbstversorgung zu erreichen, ist eine Erhöhung der Wirtschaftlichkeit und der Akzeptanz von Aquakultur erforderlich. Die ehemalige Meeresfischzucht Völklingen (MFV GmbH), die heute unter dem Namen Fresh Völklingen GmbH firmiert, betreibt in Süddeutschland vier hochmoderne, marine rezirkulierende Aquakultur-Systeme (RAS) für die Produktion von Meeresfischen. Die von Professor Waller und Mitarbeitern entwickelte Technik erlaubt eine artgerechte, betriebssichere, endverbrauchernahe Produktion von frischem Meeresfisch ohne Kontakt zum Meer. Während einer unternehmerischen Krise der MFV GmbH, die letztlich zu Verkauf des Unternehmens führte, konnte die integrierte Wasseraufbereitung jedoch nicht im erforderlichen Maße aufrechterhalten werden. Dies führte zu einem Anstieg der Mortalität der Fische. Nachdem unter neuer Führung die Kreislaufanlage wiederinstandgesetzt worden war, kehrte die Mortalitätsrate auf das vor der Krise beobachtete, niedere Niveau zurück.

In den Arbeitspaketen 1 und 2 des Teilprojekts 4 wurde die chemische Wasserqualität und das Mikrobiom in der mit Doraden (*Sparus aurata*) besetzten RAS1 der MFV/Fresh zwischen 2015 und 2016 untersucht und in Bezug gesetzt zur beobachteten Mortalität der Fische. Zur Erfassung des Mikrobioms wurden Proben an neun Stellen im Produktionsbecken und in der Wasseraufbereitung entnommen und mit Hilfe des Illumina-Sequencing-Verfahrens analysiert. Diese Mikrobiom-Analysen zeigten während der Krise mehrere, sehr starke Veränderungen in der Zusammensetzung der mit dieser Methode nachgewiesenen operationellen taxonomischen Einheiten (OTU; sie werden im Folgenden als „Bakterien“ bezeichnet). Das Mikrobiom stabilisierte sich nach der Instandsetzung des RAS1. Die Analysen zeigten nicht nur die ungeheure Vielfalt der Bakterien, die sich nach einem mehr als dreijährigen, ununterbrochenen Betrieb im RAS1 etabliert hatte, sondern verdeutlichten auch die Rolle der aus Trommelfilter und Flotationsapparat bestehenden Partikelstufen, die eine kontinuierliche Entfernung der von den Fischausscheidungen lebenden Bakterien gewährleisten. Die Untersuchungen zeigten erstmalig, dass diese Apparate eine gewisse Selektivität aufweisen und damit die Zusammensetzung des Mikrobioms beeinflussen.

Im Arbeitspaket 4.3 wurden Fische und Systemverhalten der experimentellen RAS der htw saar untersucht. Die Anlage wurde mit 1520 kleinen Wolfsbarschen (*Dicentrarchus labrax*) besetzt, die die Eingangskontrolle der Fresh Völklingen durchlaufen hatten. Im Versuchszeitraum (300 Tage) stieg ihr mittleres Gewicht von 3,4g auf 290 g pro Tier. Ab einer Besatzdichte von 40 kg m<sup>-3</sup> wurde die Fischbiomasse konstant gehalten, indem regelmäßig Fische eingefangen und an die Fresh Völklingen zurückgegeben wurden. Dies stabilisierte den Betrieb. Trotz einer relativ hohen Wassertemperatur im Sommer (bis zu 28°C) wurden nur sporadisch tote Tiere entdeckt.

Vor dem Neubesatz des RAS der htw saar zirkulierte das Prozesswasser der zuvor mit anderen Fischen besetzten Anlage mehrere Wochen ohne Fische. Dabei entstand eine von Alphaproteobakterien dominierte Bakterienflora, die sich nach dem Neubesatz in eine von Gammaproteobakterien beherrschte Flora veränderte. Die nach dem Fischbesatz häufigsten Bakterien blieben während der gesamten Betriebszeit erhalten. Mit Hilfe eines Leitbakteriums konnte gezeigt werden, dass abweichende Bakterienzusammensetzungen in drei Wasserproben auf die Präsenz von Abrieben aus Biofilmen stammten, die sich im CO<sub>2</sub>-Entgaser entwickelt hatten.

Die Bakterien vom Darmepithel und Kot der Fische erreichten nur in einer von 24 Wasserproben einem Anteil von größer als 0.1%. Dies belegt die Effizienz, mit der partikuläre Fischausscheidungen durch die kurze Verweilzeit des Prozesswassers im Produktionsbecken und die mechanischen Filter in der Wasseraufbereitung aus dem RAS entfernt wurden.

Die routinemäßig durchgeführten Konzentrationsbestimmungen von gelösten Bakteriennährstoffen, sowie die Bestimmung des biologischen Sauerstoffbedarfs zeigte, dass die für Fische giftige Bakteriennährstoffe Ammonium und Nitrit, sowie Kohlenstoffverbindungen im aeroben Biofilter durch Bakterien effektiv remineralisiert bzw. in das weniger giftige Nitrat umgewandelt wurden. Für die davon profitierenden Bakterien kann aufgrund der geringen Nährstoffkonzentration und der hohen Diversi-

tät eine Stabilisierung durch Konkurrenz (K-Selektion) postuliert werden. In beiden RAS reicherte sich jedoch ein weiterer Nährstoff, Nitrat, an. Zwar waren beide Kreislaufanlagen mit einem halbautomatischen Biofilter für bakterielle Denitrifikation ausgestattet, in welchem Bakterien Nitrat in **N<sub>2</sub>** umwandeln sollten, doch dieser Prozess war offensichtlich nicht stabil. Eine stabile biologische Entfernung von Nitrat ist jedoch erforderlich, um gesunde Fische mit hoher Produktivität und niedrigem Wasserverbrauch zu erzeugen und damit eine nachhaltige Aquakultur zu entwickeln. Diese im Rahmen von MicStaTech gemachten Beobachtungen führten an der htw saar zu einem relevanten Nebenprodukt des Projekts, der Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Stabilisierung der bakteriellen Denitrifikation, über welches eine Erfindungsmeldung verfasst wurde.

## Summary

Germany imports a large part of fishery and aquaculture products needed for industrial processing and consumers. Increasing the efficiency and acceptance of aquaculture is required to achieve a higher level of self-sufficiency. The former marine fish farm Völklingen (MFV GmbH), now Fresh Völklingen GmbH, operates four state-of-the-art, marine recirculating aquaculture systems (RAS) for the production of marine fish in Southern Germany. The technology developed by Professor Waller and co-workers allows a species-appropriate, reliable, consumer-friendly production of fresh marine fish without contact with the sea. However, during an entrepreneurial crisis of MFV GmbH, which ultimately led to the buy-out of the company, the integrated water treatment was not maintained to the required extent. This resulted in an increased fish mortality. Under new leadership, the water treatment of the RAS was restored. The mortality rate returned to the low level observed before the crisis.

In the work packages 1 and 2 of subproject 4, the chemical water quality and the microbiome of the commercial RAS1 of the MFV / Fresh were examined and the question was used whether process variables were correlated to the mortality of *Sparus aurata* dwelling in RAS1. To describe the microbiome, water and biofilms were sampled at nine points in the production basin and in the water treatment system and analyzed using the Illumine sequencing method. During the entrepreneurial crisis, the microbiome showed several very large changes in the composition of operational taxonomic units (OTU) identified by this method. OTU will hereinafter referred to as "bacteria". The composition of bacteria stabilized after repair of the water treatment of RAS1. The analyzes revealed a tremendous diversity of bacteria that had been established during three years of uninterrupted operation. They also demonstrated the role of the drum filter separation and the flotation apparatus in the water treatment system. The investigations showed for the first time that these devices have a certain selectivity and thus influence the composition of the microbiome.

In work package 4.3, fish and system behavior in the experimental RAS of htw saar were investigated. The RAS was stocked with 1520 small sea bass (*Dicentrarchus labrax*), which had passed through the entrance control of Fresh Völklingen. Over the trial period (300 days), their mean weight increased from 3.4g to 290g per animal. From a stocking density of 40 kg m<sup>-3</sup> the fish biomass was kept constant by catching fish regularly and returning them to the Fresh Völklingen. This stabilized the operation of the RAS. Despite a relatively high water temperature in the summer (up to 28°C) only sporadically dead animals were discovered.

Before refurbishing the RAS of htw saar, the plant was occupied by other fish. The process water had circulated for several weeks without fish. This resulted in a bacterial flora dominated by alphaproteobacteria, which changed into a flora dominated by gammaproteobacteria after re-stocking with *D. labrax*. The bacteria composition remained stable throughout the period of operation. However, biofilm abrasions from a CO<sub>2</sub> degasser caused deviating bacterial compositions in three water samples.

The bacteria from intestinal epithelium and faeces of fish were rarely observed in samples from the fish tank. They reached a proportion of more than 0.1% in only one of 24 samples. This demonstrated the efficiency with which particulate fish waste was removed from the fish tank by the short retention time of the process water in the tank and by the mechanical filters in the water treatment.

Dissolved bacterial nutrients as well as the biological oxygen demand were measured routinely. Measurements showed that bacteria effectively re-mineralized carbon compounds and oxidized am-

monium and nitrite into the less poisonous nitrate. Due to the low nutrient concentration and the high diversity of bacteria, a stabilization through competition (K-selection) can be postulated for the microbiome. In both RAS, however, one nutrient, nitrate, accumulated. Both RAS were equipped with a biofilter for denitrification, a bacterial process that converts nitrate to N<sub>2</sub>. This process was obviously not stable. However, a stable biological removal of nitrate is required to produce healthy fish with high productivity and low water consumption, prerequisite for sustainable aquaculture. The observations led to a relevant by-product of the project at htw saar comprising the development of a novel procedure for stabilization of bacterial denitrification. A patent is pending.