

Gefördert durch:



BÖLN

Bundesprogramm Ökologischer Landbau
und andere Formen nachhaltiger
Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Schlussbericht zum Thema “Stressresistenz und -adaption von Forellen aus Intensiv- und Extensivhaltung unter definierten Haltungsbedingungen“

FKZ: 2813NA002

Projektnehmer: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger:

CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL (CAU), Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, Institut für Tierzucht und Tierhaltung, Marine Aquakultur, Olshausenstr. 40, 24098 Kiel,
Prof. Dr. Carsten Schulz, cschulz@tierzucht.uni-kiel.de, Tel.: 04834-604216 oder 0431-8802588 und Dr. Henrike Seibel, seibel@gma-buesum.de

Stressresistenz und -adaption von Forellen aus Intensiv- und Extensivhaltung unter definierten Haltungsbedingungen, bei besonderer Berücksichtigung ökologischer Produktionspraktiken

Förderkennzeichen 2813NA002
Projektlaufzeit 01.11.2014 bis 30.11.2018

Kooperationspartner

INSTITUT FÜR FISCHEREI DER BAYERISCHEN LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, Dr. Helmut Wedekind, Weilheimer Str. 8, 82319 Starnberg, Helmut.Wedekind@lfl.bayern.de

GESELLSCHAFT FÜR MARINE AQUAKULTUR MBH BÜSUM, Dr. Henrike Seibel und Prof. Carsten Schulz, Hafentörn 3, 25761 Büsum

Büsum, 30.11.2018

Kurzfassung

Stressresistenz und -adaption von Forellen aus Intensiv- und Extensivhaltung unter definierten Haltungsbedingungen, bei besonderer Berücksichtigung ökologischer Produktionspraktiken

Henrike Seibel

Christian-Albrechts-Universität Kiel, Institut für Tierzucht und Tierhaltung, Hermann-Rodewald- Strasse 6, 24118 Kiel

seibel@gma-buesum.de

Ziel war es Forellen unterschiedlicher Herkunft auf die bestmögliche Anpassungsfähigkeit und größte Stressresistenz in Bezug auf vorgeschriebene ökologische Haltungsbedingungen (ökologisch intensive Haltung mit maximal 25 kg/ m³ und extensive, maximal 6 kg/ m³) zu untersuchen und dabei neue valide, minimal invasiv messbare Stressparameter zu etablieren. Aufhänger des Projektes war der Ablauf der Übergangsfrist der EG-Öko-VO, nach der es seit Anfang 2015 für ökologische Haltungen nicht mehr erlaubt ist nicht-ökologisch erzeugte Tiere in einen Betrieb einzubringen. Außerdem sollten nur noch Tiere aus Herkünften, die hinsichtlich Stressresistenz angepasst sind besetzt werden. Die VO gilt auch für Fische. Die veränderten Haltungsbedingungen der ökologischen Fischhaltung könnten bei nicht adaptierten Forellen zur Auslösung von Stress mit allen seinen Auswirkungen auf die Fischgesundheit führen. Um den „welfare“-Status der Forellen in Bezug auf Haltungstress besser verifizieren zu können und den Zusammenhang von chronischem Stress, Immunsuppression, Haltung und Fütterung zu untersuchen wurden verschiedene „klassische“ Stressmarker untersucht und mit potentiellen neuen, molekularen Stressmarkern in Bezug auf ihre Anwendbarkeit und Validierbarkeit verglichen. Im Verbund der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der CAU mit der Gesellschaft für Marine Aquakultur mbH (GMA) und dem Institut für Fischerei der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, sowie später dem Leibnitz Institut für Nutztierbiologie, Institut Genombiologie, Abteilung Fischgenetik (FBN) wurde nach Etablierung von molekularen Stressmarkern unter Nutzung eines Fütterungsstressmodellversuchs mit Sojabohnenmehl, die Stressresistenz und -adaptation von zwei unterschiedlichen Forellenherkünften in intensiver und extensiver ökologischer Haltung untersucht. Das Fütterungsmodell wurde auf Grund der Expertise der GMA im Bereich der aquatischen Futtermittelforschung gewählt, da zu Beginn der Studie im November 2014 molekulare Marker für Fische in der Literatur noch nicht immer stressartspezifisch unterschieden wurden und daher eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den eher auf Besatzdichte bezogenen Praxisversuch angenommen wurde.

Ein wichtiges erstes Ergebnis dieser Studie ist, dass Stressparameter immer Stressartspezifisch betrachtet werden müssen. Bisher wurde in der Literatur ein Set von potentiellen Markern beschrieben, welche unabhängig davon, ob es sich bei den Versuchen um Fütterungs-, Handling-, Temperatur- oder Stress anderer Art handelte angewendet wurden. Im Laufe des Projektes hat sich herausgestellt, dass es tatsächlich dennoch einige übergeordnete Marker gibt, die sowohl von Fütterungsstress, einer viralen Infektion und vermutlich durch Transportstress beeinflusst werden. Außerdem wurde durch den Versuch ein Modell zur Untersuchung von Stress entwickelt. Diese Ergebnisse sind in der Futtermittelforschung, bspw. zur Überprüfungen von stressmindernden oder entzündungshemmenden Futterzusatzstoffen anwendbar und ein wichtiges Nebenergebnis dieser Studie.

Insgesamt wurde mittels eines Fluidigm Biomark HD-System am FBN insgesamt die mRNA aus Blut von 88 verschiedenen Genen untersucht und teilweise mit einem Light Cycler Systems in Dummerstorf und in Büsum nachgemessen.

Neben drei Haushaltsgenen, die mittels gNorm als stabil getestet wurden, konnten die regulierten Genen den übergeordneten Signaltransduktionswegen wie der SERPIN G Superfamilie, der intrazelluläre PI3K/Aktin-, Toll-like Rezeptor-, NF- κ B-, MAP-Kinase- und JAK-STAT-Signaltransduktion oder intrazellulären Pathogenerkennungsrezeptoren zugeordnet werden. Es wurde die mRNA Expression der Blutzellen auf verschiedene pro- und anti-inflammatorische Zytokine, Chemokine, Stoffe die an der Akuten-Phase-Reaktion beteiligt, der Komplementkaskade zugeordnet werden können oder an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, sowie Hitzeschockproteine getestet. Abschließend wurden verschiedene Markergene für bestimmte Zellpopulation mit untersucht.

Als Modell wurde hier ein 56-tägiger Fütterungsversuches durchgeführt. Den triplikaten Fischgruppen wurden isoenergetische ($22,23 \pm 0,14$ MJ/ kg) und isonitrogene ($54,69 \pm 0,49$ %) Futtermischungen verabreicht, in denen das Fischmehl (Anteil an der Gesamtfuttermischung: 50 %) zu 0 %, 33 %, 66 % und 100 % durch Sojabohnenmehl (SBM) ersetzt wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass Regenbogenforellen, welche das Futter mit 100 % igem Fischmehlaustausch erhielten, signifikant niedrigere tägliche Futterraufnahmen gegenüber der Kontrollgruppe besaßen. Des Weiteren führte die zunehmende Substitution des Fischmehls durch SBM zu einer niedrigeren Futtermittelnutzung, verringerten Wachstumsergebnissen und chronischen Durchfällen. Es konnte eine SBM-induzierte Enteropathie erzeugt werden. Die Parameter Körpergewicht, K, HSI und SSI zeigten dagegen keine gruppenübergreifenden signifikanten Unterschiede. Mortalitäten traten während des Versuchszeitraumes nicht auf, jedoch konnte in allen Versuchsgruppen ein starkes Auseinanderwachsen der Fische beobachtet werden. Die Cortisol- und Hämatokritwerte (Hkt) waren nach 28 Tagen zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung, mit Ausnahme des Hkt bei SBM100, deutlich erhöht und fielen scheinbar bis zur Endbeprobung wieder ab. Signifikante Unterschiede zwischen den Sojagruppen und der Kontrollgruppe konnten nicht festgestellt werden, dennoch tendierten die Cortisol- und Hkt-Werte mit zunehmendem SBM-Anteil im Futtermittel zu höheren Werten. Gleichzeitig besaß der erhöhte Hkt eine signifikante Abhängigkeit zum Körpergewicht. Beide eben genannten Blutparameter wiesen starke individuelle Schwankungen auf, die vermutlich auf sozialen Stress und auf das starke Auseinanderwachsen der Fische zurückzuführen sind. Die Untersuchungen des Differentialblutbildes zeigten bei der Zwischenbeprobung tendenziell höhere prozentuale Anteile an Granulozyten und Monozyten und einen damit verbundenen Rückgang der Lymphozyten auf. Dies konnte durch die erhöhte mRNA Expression eines Granulozytenmarkers, LYG bestätigt werden. Zum Ende des Versuches tendierten die Lymphozyten, die neutrophilen und die eosinophilen Granulozyten wieder zum Ausgangswert zurück, während die Monozyten und basophilen Granulozytenanteile im Vergleich zur Zwischenbeprobung stagnierten. Die Unterschiede in den Blutbildern der Fütterungsgruppen waren nicht signifikant.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass Daten zu Cortisol, Hkt und Blutbild allein keine validen Stressmarker darstellen, da sie zum einen großen individuellen Schwankungen unterliegen und zum anderen vom Gewicht des Untersuchungstieres abhängig sein können. Futterraufnahme und Wachstumsparameter können weiterhin als praxistaugliche Methode zur ersten Einschätzung des „welfare“-Status von Forellen empfohlen werden.

Zur Auswahl geeigneter molekularer Stressmarker können an dieser Stelle bisher nur Vermutungen angestellt werden, tatsächliche Aussagen können erst nach durchgeführten Clusteranalysen, wie sie für die geplanten Veröffentlichungen angefertigt werden, getroffen werden.

Generell ist zu beachten, dass sich ein Praxisversuch nie auf nur eine spezifische Stressart beziehen kann, da die Forellen verschiedenen Einflüssen (Temperatur- und Sauerstoffschwankungen, Eintrag von Infektionserregern o. ä.) ausgesetzt sein können, die in einem Modellversuch kontrolliert werden können, wie sich auch in dieser Studie gezeigt

hat. Da dies in der praktischen Aquakultur jedoch immer der Fall sein wird, müssen Stressparameter darauf abgestimmt werden.

Es braucht „überordnete“ Marker, die anzeigen, ob Forellen oder andere Fischarten Stress haben oder hatten. Die untersuchten Marker, welche in der Stresskaskade weiter unten stehen sind oftmals nicht spezifisch genug. Es ist zu unterscheiden, ob mittels eines Detektionssystems genau auf einen spezifischen Stresseinfluss bspw. Fütterungsstress, Handling-Stress oder Stress durch vom Optimum abweichende Wasserwerte untersucht werden soll oder ob nur insgesamt festgestellt werden soll, ob die Forellen Stress ausgesetzt sind oder waren. Aus dem Tierschutz-Aspekt gesehen, ist es insgesamt erstmal nur wichtig beurteilen zu können, ob sich die Fische „wohlfühlen“ oder nicht, aber gerade in Bezug auf die Ursachenbekämpfung ist es essentiell verschiedene Stressereignisse voneinander abgrenzen zu können.

Gut erscheinen z. B. USP4, STAT1 und MAP3K als „übergeordnete“ Kandidaten. Beim Praxisversuch wurde das ganz deutlich in der „Erschöpfung“ dieser Gene nach 12 Wochen deutlich, nachdem die mRNA Expression zum Zeitpunkt der vermeintlichen Virusinfektion massiv hochreguliert worden war. Auch im Fütterungsexperiment werden sie durch Stress herunterreguliert. Typische „nachgestellte“ potentielle Stressmarker sind z. B. IL4, IL1 β , TNF α , TGF β aber auch Entzündungsmarker wie MPO oder NOS2, während die Aktivatoren der Akuten-Phase-Reaktion und der Komplementkaskade (SAA und PRF) ans „Ende“ einsortiert werden können, da sie eine Folge auf eine vorliegende Entzündung, als zelluläre Reaktion auf Stress, darstellen. Während SAA vermutlich eher als guter Marker für ein länger zurückliegendes Stressereignis fungieren könnte, normalisiert sich UCP sehr schnell wieder und erscheint eher für die Detektion von Stress, der noch nicht so lange zurück liegt interessant zu sein. Zur detaillierten Beurteilung von Stress wird voraussichtlich eine Kombination der untersuchten Marker die besten Ergebnisse bieten. Dies wird in der noch ausstehenden Clusteranalyse evaluiert werden.

Bezüglich der Frage zur Stressresistenz verschiedener Forellenherkünfte kann die Empfehlung gegeben werden Besatzfische am besten in der Einrichtung mit den Wasserqualitäten ausgebrütet und aufzuziehen, in der sie auch später gemästet werden sollen. Hier ist auch schon frühzeitig zu beachten, in welcher Besatzdichte die Fische später gehalten werden sollen. Zu geringe Besatzdichten können Stress erzeugen, genau wie zu hohe. Welche Besatzdichte für den Betrieb die richtige ist, ist immer auch vorerst von der Fischart, dem Management und ganz entscheidend der Wasserqualität abhängig. Da die eigene Aufzucht nicht für jeden Betrieb möglich ist, sollte beim Kauf von Besatzmaterial darauf geachtet werden, dass dieses möglichst unter vergleichbaren intensiven oder extensiven Bedingungen gezüchtet wurde, wie später gemästet werden soll. Für die ökologische Fischproduktion gilt, dass Besatzmaterial aus Betrieben mit eher extensiver Besatzdichte zugekauft werden sollte, wenn nicht direkt ökologisch produziertes Besatzmaterial zur Verfügung steht, da selbst die ökologisch intensiven Besatzdichten mit maximal 25 kg/ m³ im Vergleich zur konventionellen Aquakultur mit teilweise sehr viel größeren Fischmengen als eher niedrig anzusehen sind.

Die Ergebnisse stellen eine wichtige Grundlage dar, um „animal welfare“ in der Forellenhaltung besser beurteilen zu können. Sie sind ein wichtiger erster Schritt, um in der Zukunft fundierte, frühzeitige Einschätzungen zur chronischen Stressbelastung von Forellen treffen zu können, die minimal invasiv sind. Bisher beziehen sich die Parameter auf oftmals wenig standardisierbare Beobachtungen wie Verhalten, Farbveränderungen und ähnliches. Diese Ergebnisse hier stellen die Grundlage dar, um zukünftig praktische Detektionssysteme – vergleichbar mit einem Diabetestest – auch in Hinblick auf Aquakultur 4.0 entwickeln zu können.

Stress resistance and -adaptation of trout from intensive and extensive management under defined management conditions

Henrike Seibel

Kiel University, Institute for Animal Breeding and Husbandry, Hermann-Rodewald- Strasse 6, 24118 Kiel

seibel@gma-buesum.de

The aim was to examine trout of different origins for the best possible adaptability and greatest stress resistance in the context of ecological husbandry conditions (ecologically intensive husbandry with maximum 25 kg/ m³ and extensive, maximum 6 kg/ m³) and to establish new valid, minimally invasively measurable stress parameters. The project was based on the expiry of the transitional period of the EG-Öko-VO. Since the beginning of 2015, it has no longer been allowed to bring non-organically produced animals into an organic farm. In addition, only animals from origins that are adapted to stress should be used in husbandry. The VO also applies to fish. Different husbandry conditions of organic fish farming could lead to the triggering of stress with all its effects on fish health in the case of unadapted trout. In order to verify the welfare status of trout in context of possible husbandry stress and to investigate the relationship between chronic stress, immunosuppression, husbandry and feeding, various "classical" stress markers were investigated and compared with potential new molecular stress markers in order to their applicability and validity. In cooperation with the Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences of the CAU, the Gesellschaft für Marine Aquakultur mbH (GMA) and the Institute for Fisheries of the Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, as well as the Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Institute of Genomics, Department of Fish Genetics (FBN), the stress resistance and adaptation of two different trout origins in intensive and extensive ecological husbandry conditions was investigated after the establishment of molecular stress markers using a feeding stress model experiment with soybean meal. The feeding model was chosen based on GMA's expertise in aquatic feed research, since at the beginning of the study in November 2014 molecular markers for fish were not yet differentiated in the literature according to a stress-type and therefore a direct transferability of the results to the practical experiment was assumed.

An important first result of this study is that stress parameters must always be considered in a stress-specific way. So far, a set of potential markers has been described in literature, which were applied regardless of whether the experiments were feeding-, handling-, temperature- or stress of a different kind. In the course of the project it turned out that there are still some superordinate markers that are influenced by feeding stress, viral infection and probably transport stress. In addition, the experiment developed a model for the investigation of stress. These results are applicable in animal feed research, e.g. for the testing of stress-reducing or anti-inflammatory feed additives and are an important side result of this study.

In total, the mRNA from blood of 88 different genes was examined using a Fluidigm Biomark HD system at FBN and partly remeasured with a Light Cycler System in Dummerstorf and Büsum.

In addition to three housekeeping genes, which were tested as stable using gNorm, the regulated genes could be assigned to the superior signal transduction pathways such as SERPIN G superfamily, intracellular PI3K/actin, Toll-like receptor, NF-κB, MAP kinase and JAK-STAT signal transduction or intracellular pathogen recognition receptors. The mRNA expression of blood cells was tested for different pro- and anti-inflammatory cytokines, chemokines, substances involved in the acute phase reaction, complement cascade or inflammatory reactions, and heat shock proteins. Finally, different marker genes for specific cell populations were investigated.

As a model, a 56-day feeding experiment was carried out. The triplicate fish groups were fed isoenergetic (22.23 ± 0.14 MJ/ kg) and isonitrogenic (54.69 ± 0.49 %) feed mixtures in which

the fish meal (50% of the total diet) was replaced by 0 %, 33 %, 66 % and 100 % soybean meal (SBM).

The results show that rainbow trout fed the 100 % fishmeal replacement had a significantly lower daily feed intake than the control group. Furthermore, the increasing substitution of fishmeal by SBM led to lower feed conversion rates, reduced growth results and chronic diarrhoea. A SBM-induced enteropathy could be provoked. The parameters body weight, K, HSI and SSI did not show any significant cross-group differences. Mortalities did not occur during the experimental period, however, a strong divergence in growth and weight of fish could be observed in all experimental groups. The cortisol and haematocrit values (Hkt) were clearly increased after 28 days at the time of intermediate sampling, with the exception of the Hkt in SBM100, and apparently decreased again by the time of final sampling. Significant differences between soy groups and control group could not be detected, but the cortisol and Hkt values tended to be higher with an increasing SBM content in the diet. At the same time, the increased Hkt had a significant correlation to body weight. Both of the above mentioned blood parameters exhibited strong individual fluctuations, which are presumably due to social stress and the strong growth apart of the fish. The investigations of the differential blood count tended to show higher percentages of granulocytes and monocytes during intermediate sampling and a related decrease of lymphocytes. This was confirmed by an increased mRNA expression of a granulocyte marker, LYG. At the end of the experiment the lymphocytes, neutrophils and eosinophilic granulocytes tended to return to baseline, while the monocytes and basophilic granulocyte fractions stagnated compared to intermediate sampling. The differences in the blood counts of the feeding groups were not significant.

The test results show that data on cortisol, Hkt and blood count alone are not valid stress markers, as they are subject to large individual fluctuations and can also depend on the weight of the animal being examined. Feed intake and growth parameters can still be recommended as practical method for the initial assessment of the welfare status of trout.

For the selection of suitable molecular stress markers, only assumptions can be made at this point, actual statements can only be made after cluster analyses have been carried out, as they are prepared for the planned publications.

In general, it should be noted that a practical experiment can never refer to just one specific type of stress, since trout can be exposed to various influences (temperature and oxygen fluctuations, introduction of infectious agents, etc.), which can be controlled in a model experiment, as has also been shown in this study. However, since this will always be the case in practical aquaculture, stress parameters must be adjusted accordingly.

It requires "superordinate" markers that indicate whether trout or other fish species have or have had stress. The examined markers, which are listed below in the stress cascade, are often not specific enough. It has to be differentiated whether a detection system is to be used to investigate a specific stress influence, e.g. feeding stress, handling stress or stress caused by water values deviating from the optimum, or whether it is only to be determined overall whether the trout are or were exposed to stress. From an animal welfare point of view, it is important to be able to judge whether the fish are "comfortable" or not, but it is essential to be able to distinguish different stress events from each other, especially with regard to solve the causes.

Good candidates include e. g. USP4, STAT1 and MAP3K as "superordinate" candidates. In the practical trial this became very clear in the "exhaustion" of these genes after 12 weeks, after the mRNA expression had been massively upregulated at the time of the alleged virus infection. They are also down-regulated by stress in the feeding experiment. Typical "subordinated" potential stress markers are e.g. IL4, IL1 β , TNF α , TGF β but also inflammation markers such as MPO or NOS2, while the activators of the acute phase reaction and the complement cascade (SAA and PRF) can be sorted to the "end" because they represent a consequence of a present inflammation as a cellular reaction to stress. While SAA may be more likely to act as a good marker for a stress event a longer time ago, UCP normalizes very quickly and appears to be more interesting for the detection of stress not so long ago. For a detailed assessment of stress, a combination of the markers studied is likely to provide the best results. This will be evaluated in the pending cluster analysis.

With regard to the question of stress resistance of different trout origins, the recommendation can be made that stocking fish are best hatched and reared in the facility with the water qualities in which they are to be fattened later. The stocking density in which the fish are later to be kept should also be taken into account at an early stage. Too low stocking densities can cause stress, as can too high stocking densities. Which stocking density is the right one for the farm always depends on the fish species, the management and the water quality. Since it is not possible for every farm to breed its own fish, when purchasing stocking material, care should be taken to ensure that it is bred under comparable intensive or extensive conditions. For organic fish production, stocking material from farms with rather extensive stocking densities should be purchased if organic stocking material is not directly available, as even the ecologically intensive stocking densities of maximum 25 kg/ m³ compared to conventional aquaculture with sometimes much larger quantities of fish are to be regarded as rather low.

The results represent an important basis for a better assessment of "animal welfare" in trout farming. They are an important first step towards making well-founded, early assessments of the chronic stress levels of trout in the future, which are minimally invasive. So far, the parameters have often been based on observations such as behaviour, colour changes and the like that cannot be standardised to a great extent. These results are the basis for the development of practical detection systems - comparable to a diabetes test – in the context of aquaculture 4.0 in the future.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	3
Inhaltsverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	11
Abbildungsverzeichnis	12
Tabellenverzeichnis	14
1 Einführung	16
1.1 Gegenstand des Vorhabens	16
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes	16
1.3 Planung und Ablauf des Projektes	17
2 Wissenschaftlicher Stand und technischer Stand an den angeknüpft wurde	18
2.1 Stress bei Fischen	18
2.2 Die Regenbogenforelle	19
2.3 Sojabohnenmehl als Futterinhaltsstoff	20
2.4 Das Immunsystem von Fischen	20
2.5 quantitativen Echtzeit Polymerasen Kettenreaktion als Untersuchungsmethode	20
2.6 mRNA Expression verschiedener Gene	21
2.6.1 Haushaltsgene	21
2.6.2 Regulierte Gene	21
2.6.2.1 Übergeordnete Signaltransduktionswege	21
2.6.2.2 "Nachgestellte" Botenstoffe	23
3 Material und Methoden	28
3.1 Probennahme	28
3.2 Bestimmung der Wachstums- und Performanceleistung	28
3.3 Blutuntersuchung	29
3.3.1 Bestimmung des Hämatokritwertes (Hkt)	29
3.3.2 Differentialblutbild	29
3.3.3 Bestimmungen des Cortisolgehaltes mittels ELISA	29
3.4 Histologische Untersuchung	30
3.5 Molekularbiologische Untersuchung	30
3.6 Vorversuch, Fütterungsversuch	32
3.7 Praxisversuch, Haltungsveruch	33
3.8 Statistische Auswertung	35
4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	36
4.1 Vorversuch	36
4.1.1 Wasserqualität	36
4.1.2 Gesundheit und Verhalten	36
4.1.3 Wachstums- und Performanceleistung	36
4.1.4 Histo-pathologische Untersuchung	37

4.1.5	Blutparameter	39
4.1.5.1	Hämatokrit	39
4.1.5.2	Differentialblutbild	40
4.1.5.3	Cortisol	40
4.1.5.4	Molekularbiologische Untersuchungen im Rahmen des Vorversuchs	42
4.2	Praxisversuch	54
4.2.1	Wasserqualität	54
4.2.2	Gesundheit und Verhalten	54
4.2.3	Wachstums- und Performanceparameter	55
4.2.4	Blutparameter	57
4.2.4.1	Hämatokrit	57
4.2.4.2	Molekularbiologische Untersuchungen im Rahmen des Praxisversuchs	58
5	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	63
5.1	Fütterungsversuch mit Sojabohnenmehl	63
5.1.1	Einfluss von chronischem Stress auf die Bildung von Cortisol	64
5.1.2	Einfluss von chronischem Stress auf die Hämatologie	66
5.1.3	Einfluss von SBM auf die mRNA Expression verschiedener Gene in Blut	67
5.2	Einfluss von chronischem Stress auf Performance	70
5.3	Praxisversuch mit Forellen aus Starnberg und Wielenbach	71
5.4	Beantwortung der Untersuchungsschwerpunkte	73
6	<i>Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse</i>	76
7	<i>Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen</i>	77
8	<i>Zusammenfassung</i>	78
9	<i>Literaturverzeichnis</i>	80
10	<i>Im Berichtszeitraum realisierte Veröffentlichungen</i>	86
10.1	Bisherige Aktivitäten	86
10.2	Geplante Aktivitäten	86
II	<i>Anhang zum Schlussbericht: kurz gefasster Erfolgskontrollbericht</i>	87
1	<i>Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen</i>	87
2	<i>Wissenschaftliche und technische Ergebnisse des Vorhabens</i>	87
3	<i>Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen</i>	88
4	<i>Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende</i>	88
5	<i>Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten</i>	88
6	<i>Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit</i>	89
7	<i>Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer</i>	90
8	<i>Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung</i>	90

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ag	Antigen
CD	Kontrolldiät
cDNA	komplementäre DNA
d	Tag
DFI	tägliche Futtermaufnahme
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EU	Europäische Union
ex	extensiv
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FCR	Futterumwandlungsverhältnis
FQ	Futterquotient
gDNA	genomische DNA
GMA	Gesellschaft für Marine Aquakultur mbH
h	Stunde
HHI	Hypothalamus-Hypophysen-Interrenalorgan
Hkt	Hämatokrit
HSI	somatischer Leberindex
HSP	Hitzeschockprotein
in	intensiv, in seiner ökologischen Form (max. 25kg/m ³)
K	Fulton'scher Konditionsfaktor
L	Liter
min	Minuten
mL	Milliliter
µl	Mikroliter
mRNA	Transport-RNA
MS	Meilenstein
n	Probenmenge
ng	Nanogramm
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PRR	Mustererkennungsrezeptoren
qr-PCR	quantitative real time Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	Carboxy-X-Rhodamine
RT	Raumtemperatur
S.D.	Standardabweichung
SBM	Sojabohnenmehl
SBMIE	Sojabohnenmehl induzierte Enteropathie; Darmentzündung
sec	Sekunden
SSI	somatischer Milzindex
Sta	Starnberg
SWR	spezifische Wachstumsrate
SYBR Green	N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine
TMB	Tetramethylbenzidin
V	Versuch
Wie	Wielenbach

Die Abkürzungen aller untersuchten Gene sind auf Grund der Fülle hier nicht aufgelistet, sondern finden sich in Kapitel 2.6; Seite 21).

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Einfaktorieller Fütterungsversuch mit 3 unterschiedlich hohen Mengen an Soja-Protein im Futtermittel, 33 %, 66 % und 100 % (im Folgenden SBM33, resp. SBM66 oder SBM100) und eine Kontrolldiät (im Folgenden CD). 32
- Abbildung 2 Haltungsveruch mit jeweils verschiedenen Forellenherkünften aus extensiver („Wielenbacher“) und intensiver („Starnberger“) Erzeugung, die jeweils in ökologisch intensiver und extensiver Haltungsdichte gehalten werden. 34
- Abbildung 3 Korrelation zwischen der spezifischen Wachstumsrate, dem Futterquotienten und den Versuchsgruppen. Aufgeführt ist die mittels linearer Regressionsanalyse ermittelte Korrelation zwischen A: der spezifischen Wachstumsrate SWR (%/ d, $R^2 = 0,479$) und B: dem Futterquotient FQ (dimensionslos, $R^2 = 0,479$) mit den Versuchsgruppen (CD, SBM33, 66 und 100; $n = 51$). 37
- Abbildung 4 Histologische Beurteilung der Darmschnitte aus dem Fütterungsversuch. Die Graphiken zeigen die Anzahl an Darmschnitten ($n = 6$) die mit „normal“, „mild“, „moderat“ und „hochgradig“ bewertet wurden. Untersucht wurde auf verschiedene morphologische Charakteristika: (a) Höhe der mukosalen Zotten, (b) Zunahme von Breite und Entzündungszellinfiltration in die Submukosa, (c) Lamina propria (d), und Reduktion der supranuklearen Vakuolisierung in Enterozyten. Soy = SBM. Die Daten wurden von Elvis Chikwati, Uni Oslo erhoben. 38
- Abbildung 5 Korrelation zwischen dem Gewicht (g) und dem Hämatokrit (%) zum Zeitpunkt der Endbeprobung. $R^2 = 0,7024$. Zu den Zeitpunkten der Initial- und Zwischenbeprobung (hier nicht dargestellt) lag eine deutliche positive Korrelation vor. 39
- Abbildung 6 Zelluläre Blutzusammensetzung der untersuchten Regenbogenforellen. Aufgeführt ist die prozentuale Verteilung der Leukozyten und Thrombozyten von Forellen der vier Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) bei der Initialbeprobung (V_0 ; $n = 3$) Zwischenbeprobung (V_{zwi} ; $n = 9$), sowie bei der Endbeprobung (V_{end} ; $n = 9$). 40
- Abbildung 7 Cortisolgehalte im Serum der untersuchten Regenbogenforellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der Cortisolkonzentration (ng/mL) von jeder Fütterungsgruppe (CD, SBM 33, 66 und 100) bei der Zwischenbeprobung (4 Wochen, V_{zwi} ; $n = 6$), sowie bei der Endbeprobung (8 Wochen, V_{end} ; $n = 6$). Der Ausgangswert der Cortisolkonzentration lag bei der Initialbeprobung (V_0 ; $n = 3$) bei $2,6 \pm 0,53$ ng/mL..... 41
- Abbildung 8 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μ g RNA der Stickstoffmonoxid-Synthase. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Die Startbeprobung wurde auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen..... 45
- Abbildung 9 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μ g RNA des Mitochondrial uncoupling Protein. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Die Startbeprobung wurde auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen..... 46
- Abbildung 10 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μ g RNA der Ubiquitin spezifischen Protease 4. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$; CD: $n = 1!$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Index-Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$). Die Startbeprobung und die CD, 8 Wochen wurden auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen. 47
- Abbildung 11 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μ g RNA der MAP-3-Kinase. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$; CD: $n = 1!$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Index-

Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$). Die Startbeprobung und die CD, 8 Wochen wurden auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen. 48

Abbildung 12 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μg RNA von STAT1. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$; CD: $n = 1!$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Index-Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$). Die Startbeprobung und die CD, 8 Wochen wurden auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen..... 49

Abbildung 13 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μg RNA des Serum Amyloids A. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Die Startbeprobung wurde auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen..... 50

Abbildung 14 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μg RNA des g-Typ Lysozyms 1. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$; CD: $n = 1!$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Index-Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$). Die Startbeprobung und die CD, 8 Wochen wurden auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen. 51

Abbildung 15 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μg RNA des g-Typ Lysozyms 2. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$; CD: $n = 1!$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Index-Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$). Die Startbeprobung und die CD, 8 Wochen wurden auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen. 52

Abbildung 16 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μg RNA der Myeloperoxidase. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Die Startbeprobung wurde auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen. 53

Abbildung 17 Gesamte Mortalität bei Regenbogenforellen aus dem Praxisversuch mit unterschiedlichen Besatzdichten. Angegeben ist jeweils die Gesamtzahl toter Forellen in Versuchswoche 1 bis 12. Sta = Starnberg; Wie = Wielenbach; in = intensiv; ex = extensiv; E bezeichnet die Teiche 1, 2 und 7 und 8. Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg) erhoben..... 55

Abbildung 18 Anzahl toter Wielenbach-Forellen aus der extensiven Haltung nach Versuchstagen. Angegeben ist jeweils die Anzahl toter Forellen zu bestimmten Zeitpunkten. Die Zahl an den Punkten beschreibt die genaue Zahl. Die Zeiträume der 3. bis 5. Versuchswoche wurden farblich markiert. Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg) erhoben. 55

Abbildung 19 Durchschnittliches Gewicht der Regenbogenforellen aus Starnberg. Dargestellt ist das mittlere Gewicht im Verlauf des Versuchszeitraums von 84 Tagen für die beiden unterschiedlichen Besatzdichten: intensiv (initial 7,62 kg/ m^3 ; final 22,95 kg/ m^3) und extensiv (initial 2,0 kg/ m^3 ; final 5,83 kg/ m^3). Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg, Deutschland) erhoben. $n = 100$ 56

Abbildung 20 Durchschnittliches Gewicht der Regenbogenforellen aus Wielenbach. Dargestellt ist das mittlere Gewicht im Verlauf des Versuchszeitraums von 84 Tagen für die beiden unterschiedlichen Besatzdichten: intensiv (initial 7,62 kg/ m^3 ; final 18,19 kg/ m^3) und extensiv (initial 2,0 kg/ m^3 ; final 5,91 kg/ m^3). Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg, Deutschland) erhoben. $n = 100$ 56

Abbildung 21	Im Praxisversuch getestete Gene I. Dargestellt ist die normalisierte mRNA Expression vom Myxovirus 1 (MX1), Interleukin 4 (IL4), Tumor Nekrose Faktor $\alpha 2$ (TNFa2), Tumor Growth Faktor β (TGFb), Interleukin 1 β (IL1b) und Perforin (PRF) für die unterschiedlichen Haltungsguppen zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Einzelne statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels Balken und wenn $p = \leq 0,05$ mittel Stern gekennzeichnet.	60
Abbildung 22	Im Praxisversuch getestete Gene II. Dargestellt ist die normalisierte mRNA Expression von STAT1, MAP-3-Kinase (MAP3K), Nicht spezifisches zytotoxisches Zellrezeptor Protein (NCCRP1), Lysozym G1 (LYG1), Stickstoffmonoxid Synthase (NOS2) und Ubiquitin spezifische Protease 4 (USP4) für die unterschiedlichen Haltungsguppen zu drei verschiedenen Zeitpunkten ($n = 6$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Einzelne statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels Balken und wenn $p = \leq 0,05$ mittel Stern gekennzeichnet.	61
Abbildung 23	Im Praxisversuch getestete Gene III. Dargestellt ist die normalisierte mRNA Expression der Myeloperoxidase (MPO) und des Mitochondralen Uncoupling Proteine (UCP) für die unterschiedlichen Haltungsguppen zu drei verschiedenen Zeitpunkten ($n = 6$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Einzelne statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels Balken und wenn $p = \leq 0,05$ mittel Stern gekennzeichnet.	62
Abbildung 24	Darstellung der normalisierten mRNA Expression von Serum Amyloid A aus dem Praxisversuch. Dargestellt sind die unterschiedlichen Haltungsguppen zu drei verschiedenen Zeitpunkten ($n = 6$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Einzelne statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels Balken und wenn $p = \leq 0,05$ mittel Stern gekennzeichnet.	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Inhaltsstoffe und Zusammensetzung der im Fütterungsversuch eingesetzten Futtermittel. CD = Kontrolldiät; SBM = Sojabohnenmehl; 33, 66 und 100 = Prozentanteil zu dem die 50% Fischmehl aus der CD gegen Sojabohnenmehl ausgetauscht wurden.	33
Tabelle 2	Berechnung der Fütterungsmenge in Prozent Körpermasse im Praxisversuch. Dargestellt ist die berechnete, angepasste Menge in % Körpermasse (% KG) für die verschiedenen Versuchsansätze nach Wochen. Die Anpassung der Futtermenge erfolge jeweils nach der 2-wöchigen Zwischenwiegung. Sta = Starnberg; Wie = Wielenbach; in = intensiv; ex = extensiv; E bezeichnet die Teiche 1, 2 und 7 und 8. Sta = Starnberg. Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg) erhoben.	35
Tabelle 3	Wachstums- und Performancleistung der untersuchten Regenbogenforellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) für das durchschnittliche Initial- und Endgewicht (g, $n = 51$) eines Fisches, der Fulton'sche Konditonsfaktor (K, dimensionslos, $n = 12$), die tägliche Futteraufnahme (DFI, %/ d, $n = 51$), der Futterquotient (FQ, dimensionslos, $n = 51$), die spezifische Wachstumsrate (SWR, %/ d, $n = 51$), der Hepatosomatische Index (HSI, dimensionslos, $n = 12$) und der Splenosomatische Index (SSI, dimensionslos, $n = 12$). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Index-Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$).	37
Tabelle 4	Hämatokritwerte der untersuchten Regenbogenforellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Hämatokritwerte (Hkt, %) jeder Fütterungsgruppe (CD, SBM 33, 66 und 100) bei der Zwischenbeprobung (V_{zwi} ; $n = 9$), sowie bei der Endbeprobung (V_{end} ; $n = 9$). Der Ausgangswert vom Hkt lag bei der Initialbeprobung (V_0 ; $n = 3$) bei $22,13 \pm 3,36$ %.	39
Tabelle 5	Cortisolgehalte im Serum der untersuchten Regenbogenforellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der Cortisolkonzentration (ng/ mL) von jeder Fütterungsgruppe (CD, SBM 33, 66 und 100) bei der Zwischenbeprobung (V_{zwi} ; $n = 6$), sowie bei der Endbeprobung (V_{end} ; $n = 6$). Der Ausgangswert der Cortisolkonzentration lag bei der Initialbeprobung (V_0 ; $n = 3$) bei $2,6 \pm 0,53$ ng/ mL.	41

<i>Tabelle 6</i>	<i>Im Fütterungsversuch getestete Gene. Dargestellt sind die getesteten Gene mit Abkürzung. Den ausführlichem Namen und eine kurzer Beschreibung ihrer Funktion und/oder Wirkung finden sich in Kapitel 2.6, Seite 20. Die mRNA Expression wurde mittels Fluidigm oder light Cycler qPCR System quantitativ bestimmt; * = es lagen signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede vor; X (grün): Unterschiede in der mRNA Expression zwischen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) oder zu unterschiedlichen Beprobungszeitpunkten waren sichtbar; X: mRNA war nachweisbar aber es lagen keine Unterschiede zwischen Fütterungsgruppen vor.</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 7</i>	<i>Wasserparameter des Praxisversuchs mit zwei verschiedenen Forellenherkünften und Besatzdichten. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der Haltungsguppen für Temperatur ($^{\circ}\text{C}$, $n = 80$), des Sauerstoffgehaltes (mg/ L und %, $n = 80$), des pH Wertes (dimensionslos, $n = 80$) und der Leitfähigkeit (μS, $n = 80$). Sta = Starnberg; Wie = Wielenbach; in = intensiv; ex = extensiv; E bezeichnet die Teiche 1, 2 und 7 und 8. Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg) erhoben.</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 8</i>	<i>Wachstums- und Performanceleistung der untersuchten Regenbogenforellen des Praxisversuchs. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der Haltungsguppen für das durchschnittliche Initial- und Endgewicht (g, $n = 50$) eines Fisches, der Fulton'sche Konditonsfaktor (K, dimensionslos, $n = 50$), der Futterquotient (FQ, dimensionslos, $n = 50$) und die spezifische Wachstumsrate (SWR, %/ d, $n = 50$). Sta = Starnberg; Wie = Wielenbach; in = intensiv; ex = extensiv; E bezeichnet die Teiche 1, 2 und 7 und 8. Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg) erhoben.</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 9</i>	<i>Hämatokritwerte der untersuchten Regenbogenforellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Hämatokritwerte (Hkt, %) jeder Haltungsguppe beim Versuchsstart, der Zwischenbeprobung (V_{zwi}; nach 7 Wochen $n = 6$), sowie bei der Endbeprobung (V_{end}; nach 12 Wochen $n = 6$).</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 10</i>	<i>Im Praxisversuch getestete Gene. Dargestellt sind die getesteten Gene mit Abkürzung. Den ausführlichem Namen und eine kurzer Beschreibung ihrer Funktion und/oder Wirkung finden sich in Kapitel 2.6, Seite 20. Die mRNA Expression wurde mittels light Cycler qPCR, ARIA MX System quantitativ bestimmt; n. n. = der Primer hat nicht funktioniert; * = es lagen signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede der mRNA Expression zwischen Haltungsguppen (Starnberg intensiv und extensiv, Wielenbach intensiv und extensiv) vor.</i>	<i>58</i>

1 Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Der Umsatz von ökologisch erzeugten Lebensmitteln hat seit 2004 in Deutschland einen enormen Aufschwung verzeichnet und 2007 bzw. 2009 wurde mit der „EG-Öko-VO“ (Verordnung EG Nr. 834/2007 + EC 710/2009) eine Rechtsgrundlage geschaffen, welche sich mit Haltungsverfahren und Ökoproduktvermarktung beschäftigt und die Aquakultur mit einschließt. Darin wird immer wieder darauf hingewiesen, dass die ökologische/ biologische Tierhaltung auf hohe Tierschutzstandards achten, sowie den tierartspezifischen verhaltensbedingten Bedürfnissen genügen soll. Bei der Indikatorenentwicklung zur Beurteilung und Festlegung dieser Standards ist man in der Aquakultur noch nicht so weit, wie auf dem terrestrischen Sektor.

In der deutschen Nutzfischhaltung wurden bisher vor allem ökonomische Fragestellungen¹⁻³ oder Untersuchungen der generellen Produktqualität fokussiert. Erst neuerdings werden Aspekte des Wohlergehens der Fische („animal welfare“) während des Produktionsprozesses mit berücksichtigt. Diese Studie stellt erste weiterführende Ergebnisse zur Beurteilung von Fischwohl in der ökologischen Haltung dar.

In der EG-Öko-VO wird zu „Wohlergehen“ Stellung genommen, indem die Gesunderhaltung des Tierbestands auf der Krankheitsvorbeugung basieren soll. Besondere Aufmerksamkeit ist in diesem Zusammenhang den Bedingungen der Haltungspraktiken und der Besatzdichte zu schenken. Der Begriff „animal welfare“, welcher anfangs als der „Zustand des Tieres, welcher durch die Wahrnehmung seiner Umwelt entsteht“⁴ definiert und später als „Abwesenheit von Angst, Schmerz und Frustration“⁵ erweitert wurde, bleibt beim Fisch vage. Mit den Ergebnissen dieser Studie kann er besser eingegrenzt werden.

Unter bestimmten Bedingungen war es bisher möglich nicht-ökologisch/ nicht-biologisch erzeugte Tiere in einen Betrieb einzubringen, wenn keine Jungbestände aus ökologischen/ biologischen Betrieben erhältlich sind. Diese Übergangsfrist endete 2015. Seitdem muss der Besatz vollständig aus ökologischer oder biologischer Haltung erfolgen (EG-Öko-VO Art. 15 (1) a, i). Aus ökonomischen und technischen Gründen kaufen ökologisch als auch extensiv, konventionell produzierende Forellenbetriebe häufig weiterhin Brutmaterial zu, welches ohne Selektion auf die spezifischen Haltungsbedingungen der biologischen Aquakultur produziert wird. Die konventionellen Forellen aus intensiver Haltung konnten sich demgegenüber im Laufe der historisch gewachsenen Forellenzucht bestens an die Haltung adaptieren. Für Forellen unter ökologischen und extensiven Haltungsbedingungen kann dies jedoch nicht vorausgesetzt werden und eine zielgerichtete, phänotypische Selektion zu adaptiven Prozessen benötigt einen vergleichsweise langen Zeitraum von mind. fünf Generationen⁶. Daher sollten in dieser Studie unterschiedliche Herkünfte auf ihre Stressresistenz geprüft werden, da angenommen werden kann, dass die veränderten Haltungsbedingungen der extensiven Fischhaltung (z. B. Haltungsdichte, Fütterungs- und Haltungsmanagement, etc.) bei nicht adaptierten Forellen zur Auslösung von Stress bei unterschiedlichen Besatzdichten, mit allen seinen Auswirkungen auf die Fischgesundheit führen können.

Die Identifizierung von Methoden zur Feststellung der Stressbelastung ist dafür Voraussetzung. Die zu untersuchenden Parameter sollen zudem praxistauglich, minimal invasive und valide sein.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

Es war die Aufgabe dieser Studie die Methodenentwicklung von chronischen Stressmarkern voranzutreiben, um „animal welfare“ in Bezug auf Stress am Beispiel der Regenbogenforelle besser definieren zu können und im Anschluss Forellenhkünfte auf ihr Potential, sich an

vorgegebene ökologisch extensive und ökologisch intensive Haltungsbedingungen anzupassen zu untersuchen.

Ziel war es statistisch auswertbare Parameter zu etablieren, um den „welfare“-Status der Forellen in Bezug auf Stress besser verifizieren zu können und den Zusammenhang von chronischem Stress, Immunsuppression, Haltung und Fütterung zu untersuchen. Es wurden in dieser Studie Forellen aus zwei unterschiedlichen Herkunft (Starnberg und Wielenbach), welche in unterschiedlichen Besatzdichten aufgezogen wurden, jeweils unter ökologisch intensiven und extensiven Haltungsbedingungen gehalten und ihre Anpassungsfähigkeit und Stressresistenz in Bezug auf die vorgeschriebenen ökologischen Haltungsbedingungen untersucht. Zur Untersuchung wurde Blut als minimal invasiv zu beprobendes Organ gewählt. Neue molekulare Marker wurden mit bisher gängigen Parametern verglichen.

Die Richtlinie des BMELV zur Förderung von Forschungs- und Entwicklungsvorhaben sowie von Maßnahmen zum Technologie- und Wissenstransfer für eine nachhaltige Erzeugung, Verarbeitung und Vermarktung von landwirtschaftlichen Produkten verfolgt das Ziel, die Rahmenbedingungen für die Ausdehnung einer nachhaltigen Landwirtschaft und Lebensmittelwirtschaft zu verbessern. Die Ergebnisse dieser Studie liefern wichtige Aspekte für eine fundierte Einschätzung der Gesundheitsprophylaxe und die Aufrechterhaltung eines hohen Tierschutzstandards, der den tierartspezifischen, verhaltensbedingten Bedürfnissen genügt, wie sie in der „EG-Öko-Verordnung“ gefordert werden.

Das Vorhaben nimmt insofern Bezug auf die Ziele der Richtlinie des BMELV, als dass in ihr auswertbare Parameter entwickelt werden, um die Anpassungsfähigkeit und Stressresistenz von Forellen objektiv beurteilen zu können. Damit werden, gemäß der förderpolitischen Ziele der Richtlinie Rahmenbedingungen für die Ausdehnung einer nachhaltigen Landwirtschaft und Lebensmittelwirtschaft verbessert.

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Die Arbeitsziele boten eine Verknüpfung zwischen den Bereichen der Grundlagen- und der angewandten, praxisrelevanten Forschung.

Das Projekt startete im November 2014. Zunächst wurde ein molekularbiologisches Labor an der GMA eingerichtet. Dies umfasste alle Aspekte wie Planung und Organisation, Grundreinigung und Dekontamination sowie Einrichtung des Labors unter Berücksichtigung aller rechtlichen und technischen Vorgaben. Diese Arbeiten (Meilenstein, MS 1) wurden planmäßig bis Ende Februar 2015 abgeschlossen. Im ersten Projektjahr stand die Etablierung der molekularbiologischen Untersuchungsmethoden von Stressparametern bei der Forelle aus Blutproben im Vordergrund (MS 2). Diese stellte sich letztlich schwieriger als ursprünglich geplant dar, da nicht, wie erwartet, bereits in der Literatur veröffentlichte Primer verwendet werden konnten. Diese waren zwar spezifisch für die Forelle, jedoch ließen sie sich nicht – wie angenommen – für die Untersuchung von Blut verwenden. An Hand des Forellengenoms wurden für jedes zu untersuchende Gen neue spezifische Primer etabliert. Zur Gewinnung von Probenmaterial von unterschiedlich stark gestressten Forellen wurde an der GMA ein ein-faktorieller Fütterungsversuch (Vorversuch; MS 3) mit Regenbogenforellen durchgeführt, welche mit unterschiedlich hohen Konzentrationen von Sojabohnenmehl gefüttert wurden. In diesem Vorversuch wurden verschiedene Proben entnommen, dessen Auswertung in Hinblick auf Stressparameter die Grundlage für den folgenden Praxisversuch darstellte (MS 4). Obwohl es zunächst durch die Etablierung neuer Primer und langwierigen Anpassungen des PCR Protokolls für die Bearbeitung von Blutproben zu leichten Verzögerungen im Projektablauf kam, konnten letztlich durch eine im Laufe des Projektes entstandene Kooperation mit der Abteilung für Fischgenetik des Leibniz Instituts für Nutztierbiologie eine sehr viel größere Anzahl an Stressmarker-Kandidaten untersucht werden, als anfangs geplant.

Bei der Durchführung des Praxisversuchs mit zwei unterschiedlichen Forellenherkünften (Starnberg und Wielenbach) kam es zu Abweichungen vom geplanten Zeitplan (MS 5). Der

ursprünglich für zwischen Mai 2016 und Dezember 2016 geplante Versuch, wurde bereits ab Oktober 2015 durch den Kooperationspartner in Starnberg durchgeführt (Ergebnisse werden in diesem Bericht nicht vorgestellt). Der Versuch konnte auf Grund eines technischen Ausfalls jedoch nur für eine Herkunft (Starnberg) abgeschlossen werden. Auf Grund der Notwendigkeit der direkten Vergleichbarkeit der Daten wurde der gesamte Versuch daher noch einmal im Frühjahr 2017 wiederholt. Leider traten auch hierbei durch eine natürlich eingetragene Infektionen, wahrscheinlich viraler Art Mortalitäten in einer Gruppe auf. Diese Gefahr besteht bei Freilandversuchen leider immer. Die Datenanalyse wurde dennoch planmäßig bis November 2017 abgeschlossen (MS 6), musste jedoch in der Bewertung angepasst werden, da durch die Infektion und ihren Einfluss auf das Immunsystem der Fische nicht mehr alleinig Unterschiede in der Besatzdichte bewertet werden konnten. Im Rahmen der einjährigen Projektverlängerung wurden die bereits vorhandenen Proben aus beiden Versuchen auf weitere potentielle, übergeordnete Stressmarker hin untersucht (MS 9 und 10).

2 Wissenschaftlicher Stand und technischer Stand an den angeknüpft wurde

2.1 Stress bei Fischen

Verschiedene Studien beschäftigen sich mit Stress bei Fischen. Dabei stehen neben spezifischen Fragestellungen in erster Linie allgemeine Haltungsparameter wie die Wassertemperatur ⁷, der Sauerstoffgehalt im Wasser ⁸, Besatzdichten ^{9,10} oder die Beckengestaltung wie Hintergrundfarbe ¹¹ im Fokus der Untersuchungen. Stressempfindlichkeit ist als eine verminderte Anpassungsfähigkeit des Organismus an physische und psychische Belastungen zu definieren.

Eine Stressantwort wirkt über die Reizaufnahme, neuronale Reaktionen, Transport von Botenstoffen im Blut und deren Wirkung auf unterschiedliche Zielzellen, die wiederum in spezifischer Art und Weise reagieren. Hauptquelle für die Produktion von Stresshormonen (Katecholamine) sind bei Fischen die chromaffinen Zellen der Kopfniere, während die Zwischennierenzellen Cortisol ausschütten. Cortisol wirkt in einem Feedback-Mechanismus wiederum hemmend auf die Sekretion des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) ^{12,13}. Für die Stärke oder Dauer eines Stressors wird der Anstieg bzw. der Abfall besonders der Cortisolkonzentration im Blutserum gemessen und dient bei Fischen als Leitparameter um die Intensität eines akuten Stressors und des damit verbundenen primären Stress abzuschatzen ¹⁴⁻¹⁶. Die genannten Hormone nehmen ihrerseits wieder Einfluss auf unterschiedliche Immunzellen, die dann selbst Botenstoffe (Zytokine, Akute Phase Proteine, Tumor Nekrose Faktoren, etc.) ausschütten. Chronischer Stress kann durch verschiedene Situation hervorgerufen werden. Eine davon ist zum Beispiel sozialer Stress, welcher mit der Besatzdichte und Größenvariationen der Fische korreliert. Juvenile Salmoniden sind aggressiv und territorial und entwickeln Dominanz-basierte soziale Strukturen, sowohl unter natürlichen Lebensbedingungen in Flüssen ¹⁷ als auch unter experimentalen Bedingungen ^{18,19}. Die untergeordneten Fische zeigen dabei abgeschwächtes Verhalten mit reduziertem Wachstum und Futteraufnahme, weshalb sie oft kleiner sind, als ihre dominanteren Artgenossen ²⁰⁻²². Eine andere Ursache für chronischen Stress ist eine inadäquate Ernährung. So kommt es beispielsweise durch den Einsatz von zu viel Sojaprotein in der Ernährung von Salmoniden zu Durchfallerkrankungen und Dybakteriosen ²³. Stress kann daneben auch noch durch verschiedenste andere Ereignisse, wie bspw. Sauerstoffmangel, Temperaturschwankungen oder Handling hervorgerufen werden ¹². Dabei ist die Grenze zwischen mildem, stimulierendem Eustress und starkem chronischem, krankmachendem Distress fließend ²⁴⁻²⁶.

Der Körper reagiert auf ein Stressereignis mit einem komplexen Repertoire an Verhaltens- und physiologischen, adaptiven Reaktionen, die alle miteinander wie Zahnräder in einander greifen. Das „Allgemeine Anpassungssyndrom“ beschreibt die Stressreaktion als

Reaktionsmuster zur Anpassung des Körpers an länger anhaltende Stressreize, die sich in drei Phasen aufteilen. In der ersten akuten Phase (Alarmreaktion) kommt es auf neuroendokriner Ebene zur Ausschüttung von Stresshormonen (z. B. Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin, Cortisol, Serotonin). Ein klassisches Symptom wären z. B. plötzliche Verhaltensänderungen, wie Fluchtreaktionen, die beobachtet werden können. Diese ausgeschütteten Stresshormone sorgen in verschiedenen Geweben für die Bereitstellung von Energiereserven, um eine erhöhte Aktivität und Leistungsbereitschaft des Organismus zu gewährleisten. Alles läuft nach einem Regelkreismechanismus, vergleichbar mit dem System wie beim Menschen ab. In der zweiten Phase (Resistenz) können physiologische Veränderungen festgestellt werden (z. B. erhöhte Anzahl roter Blutkörperchen oder ein erhöhter Blutglukosespiegel). In dieser Phase wird auch eine erhöhte Ventilation der Kiemen beobachtet, da der Körper vermehrt Sauerstoff benötigt. Es werden Stresshormone abgebaut und die Wiederherstellung des normalen Zustandes wird angestrebt. Die Resistenzphase kann jedoch nur für einen gewissen Zeitraum aufrechterhalten werden, bevor bei anhaltendem Stress die dritte Phase, das "Erschöpfungsstadium" eintritt. In dieser Phase kann die Homöostase nicht länger aufrechterhalten werden. Es kommt zur Immunsuppression mit einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit, sowie weiteren Folgen wie vermindertes Wachstum bei schlechter Futteraufnahme, schlechte Reproduktionsleistung, Größenvariationen oder Todesfälle.

Physiologisch stellen sich die Anzeichen für chronischen Stress bei Salmoniden in Form einer aktivierten Hypothalamus-Hypophysen-Interrenalorgan (HHI)-Achse und einem erhöhten Serotonin-Metabolismus im Gehirn dar ^{18,27-29}. Die Level im Blutplasma von Cortisol, ACTH und dem α -Melanozyten-stimulierenden Hormon (α -MSH) von Seelaibling (*Salvelinus alpinus* L.) signifikant von sozialem Stress beeinflusst werden. Auch Hitze-Schock-Proteine (HSP70, HSC70 und HSP90) werden in dominanten Hierarchien und damit auftretenden sozialen Stresssituationen von Salmoniden ausgeschüttet ⁹.

Die erhöhte Anfälligkeit für Krankheiten ist ein empfindlicher Indikator für Stress. Typische Beispiele von stressassoziierten Infektionskrankheiten sind die Furunkulose, Pseudomonasinfektionen oder die Myxobakteriose ³⁰. Bei Regenbogen- (*Oncorhynchus mykiss*) und Bachforellen (*Salmo trutta*) korreliert das Auftreten von Krankheiten mit einer stressinduzierten erhöhten Cortisolkonzentration ³¹⁻³⁴. Darüber hinaus bildet die angemessene Ernährung der Fische in den Gewässern, Teichen und Anlagen eine wesentliche Grundlage für eine gute Kondition und eine hohe Belastungsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen. Bei Forellen handelt es sich um eine natürlicherweise karnivore Fischart. Neben der Besatzdichte und tierartspezifischen Ernährung, trägt auch die Beckenausstattung zum Wohlbefinden der Fische bei ³⁵.

Es ist zudem bekannt, dass Forellen aus unterschiedlichen Herkunftsorten eine variierende Stressresistenz aufweisen können ^{36,37}. Untersuchungen unter ökologischen Haltungsbedingungen liegen jedoch bisher nicht vor. Die Zuchtauswahl zielt primär auf produktionsökonomische Merkmale wie Wachstums- und Überlebensraten, Futteraufnahme und Krankheitsresistenzen ab ⁶. Jedoch ist gerade das Wohlbefinden der Fische ein wichtiger Aspekt für eine gesunde und angepasste Fischproduktion.

2.2 Die Regenbogenforelle

Als Modellorganismus für diese Studie wurde die Regenbogenforelle gewählt. Durch ihre Anpassungsfähigkeit, Fressgier, gute Futterverwertung und schnelles Wachstum, zählt die Forelle zu den wirtschaftlich bedeutendsten Salmonidenarten in der Aquakultur ³⁸⁻⁴⁰. Die weltweite Gesamtproduktion von Regenbogenforellen belief sich nach Einschätzungen der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nation (FAO) im Jahr 2013 auf ca. 814.068 Tonnen ⁴¹. Davon wurden rund 188.000 Tonnen in Europa produziert (EUMOFA). Innerhalb der EU zählen gegenwärtig Italien, Frankreich, Dänemark, Spanien und Polen zu den wichtigsten Produzenten. Die Produktion der Forellen wird in Deutschland aus

wirtschaftlichen Gründen fast durchweg in Monokulturen durchgeführt, die in intensiv betriebenen Durchflussanlagen oder in Netzkäfigsystemen aufgezogen werden ^{41,42}.

2.3 Sojabohnenmehl als Futterinhaltsstoff

Da zu Beginn der Studie im November 2014 molekulare Marker für Fische in der Literatur noch nicht immer stressartspezifisch unterschieden wurden, was auch ein wichtiges Ergebnis dieser Studie ist, entschieden sich die Zuwendungsempfänger, auch auf Grund der an der GMA vorliegenden Expertise im Bereich der Futtermittelforschung im Bereich Aquakultur, zur Etablierung der „Marker“ unter Stress ein Fütterungsmodell mit Sojabohnenmehl gewählt, obwohl im Praxisversuch der Schwerpunkt auf der Besatzdichte lag. Die Verabreichung von Soja-Produkten kann bei karnivoren Fischen zu einer Reihe von metabolischen und gesundheitlichen Veränderungen führen ⁴³. Vor allem pathomorphologische Veränderungen des Verdauungstraktes wurden in vielen Ernährungsstudien mit Sojaprodukten beschrieben ^{44,45}. Charakteristisch hierbei waren Veränderungen des distalen Darmepitheliums, die sich häufig durch eine reduzierte Anzahl oder Verkürzung der Mikrovilli, Veränderungen der absorptiven Zellen, sowie eine Reduzierung der Endozytoseaktivität äußerten ^{43,46–48}. Nach bisherigem Wissensstand wird davon ausgegangen, dass die Veränderungen größtenteils durch antinutritive Inhaltsstoffe hervorgerufen werden ^{43,49}. So wurde gezeigt, dass Soja-Saponine die Membranpermeabilität negativ beeinflussen und somit die Darmbarriere nachhaltig stören ⁴³. Neben dem Saponin kommen noch Lectine, Phytoestrogene, Antivitamine, Allergene, Phytinsäure und Proteaseinhibitoren in Soja vor, die sich negativ auf den Fischorganismus auswirken ⁴⁹.

Da es durch die diversen schädigenden Auswirkungen auf den Fischorganismus und damit einhergehendem Stress häufig zu Immunsuppressionen kommt und Sekundärinfektionen begünstigt werden, handelt es sich um ein geeignetes Stressmodell.

2.4 Das Immunsystem von Fischen

Bei der Analyse potentieller Stressmarker war zu beachten, dass das Immunsystem von Fischen zwar dem der Wirbeltiere ähnelt, es dennoch aber einige wichtige Unterschiede gibt. Die adaptive Immunantwort ist bei Fischen vergleichsweise eingeschränkt und die angeborene Immunität ist bei der Erregerabwehr von hauptsächlicher Bedeutung. Das angeborene Immunsystem besteht aus der epithelialen und mukosalen Barriere, humoralen Komponenten und den Immunzellen ⁵⁰. Die wichtigsten Lymphorgane in Fischen sind Thymus, Niere und Milz. Darüber hinaus sind Schleimhaut-assoziierte Lymphgewebe wie Haut oder Kiemen für die Abwehr von Krankheitserregern in einer aquatischen Umgebung von entscheidender Bedeutung ⁵¹. Pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs) werden über Muster-Wiedererkennungszuzeptoren (PRRs) erkannt und verschiedene nicht-spezifische Immunreaktionen werden ausgelöst: unspezifische zelluläre Zytotoxizität durch zytotoxische Zellen, Produktion von antimikrobiellen Peptiden, Phagozytose durch Neutrophile und Makrophagen, Aktivierung des Komplementärsystems sowie Synthese und Sekretion von Zytokinen, Lysozym- und Akute Phase-Proteinen ^{50,52}. Die Ausschüttung einzelner dieser Marker kann man sich für die Beurteilung von Stress zu Nutzen machen.

Die adaptive Immunantwort bei Fischen ist im Vergleich zu höheren Wirbeltieren schlecht; Dennoch zeigen Fische Antikörperreaktionen und ein immunologisches Gedächtnis. Immunglobulin M (IgM) ist der vorherrschende Antikörper bei Teleostiern. Die IgM-Konzentrationen sind je nach Art, Temperatur und Infektionsgrad sehr variabel ⁵⁰.

2.5 quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion als Untersuchungsmethode

Technisch wurde die etablierte Methode der quantitativen Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qPCR) verwendet, welche es möglich macht, genaue Kopienzahlen der mRNA Expression zwischen Versuchsgruppen zu untersuchen. Jeder Zyklus besteht aus drei Phasen: Denaturierung, Annealing und Elongation. So ist es möglich, die Anreicherung

des Produktes in Echtzeit zu verfolgen und die Anfangsmenge der mRNA zu berechnen. Zur Messung der DNA-Menge wird ein fluoreszierendes Nachweissystem verwendet. Die gängigsten Fluoreszenzdetektionssysteme sind 5 Nuclease-Assays wie TaqMan® Assays und SYBR® Green Farbstoff basierende Assays (Life Technologies 2014). Der SYBR® Green Farbstoff basierte Assay arbeitet mit einem fluoreszierenden Farbstoff, der in doppelsträngige DNA eingebaut wird und wurde hier verwendet. Gebundenes SYBR® Green erzeugt ein deutlich höheres fluoreszierendes Signal im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff (Life Technologies 2014), weshalb es zur Erkennung der synthetisierten Kopien des Zielgens verwendet wird. SYBR® Green Farbstoff basierte Assays sind anfällig für Spezifitätsprobleme, was es notwendig macht, eine Dissoziationsanalyse durchzuführen, nachdem die qPCR abgeschlossen ist. Durch das allmähliche Schmelzen der PCR-Produkte wird die Schmelztemperatur bestimmt. Zur Normalisierung von Fluoreszenzsignalen wird ein passiver Referenzfarbstoff verwendet (Life Technologies 2014).

2.6 mRNA Expression verschiedener Gene

Es wurde die mRNA Expression in Blut einer Reihe von Gene, die in der Literatur bisher in Zusammenhängen mit Themen wie Entzündung, Immunantwort und -regulation, Signaltransduktion u. a. beschrieben wurden darauf untersucht, in wie fern sie eine Rolle im Zusammenhang mit Stress spielen und als potentielle Stressmarker in Frage kommen würden.

Noch nicht alle der genannten Gene wurden bereits für die Forelle oder andere Fischarten beschrieben bzw. vollständig in ihrer Funktion erforscht. Wenn nicht ausdrücklich eine Spezies genannt wird, beziehen sich die allgemeinen Angaben zu den untersuchten Signaltransduktionswegen und Genen auf Forschungen bei Maus und/ oder Mensch.

2.6.1 Haushaltsgene

Ein Haushaltsgen ist ein Gen, welches unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird, im Gegensatz zu den regulierten Genen⁵³.

Hier wurden verwendet:

- **EEF1A** Elongations Faktor 1
- **ACTB** Actin beta
- **RPS5** Ribosomales Protein S5

2.6.2 Regulierte Gene

2.6.2.1 Übergeordnete Signaltransduktionswege

Das **SERPING1-Gen** kodiert die Anleitung zur Herstellung eines Proteins namens C1-Inhibitor, das eine Art Serinprotease-Inhibitor (SERPIN) ist. SERPINs helfen dabei, verschiedene Arten von chemischen Reaktionen - einschließlich Entzündungen - zu kontrollieren, indem sie die Aktivität bestimmter Proteine blockieren.

Die SERPING Superfamilie ist bereits in verschiedenen Fischarten, wie bspw. Forellen, Welsen, Karpfen oder Brassen nachgewiesen wurden⁵⁴⁻⁵⁷

Aus diesem Komplex wurde die mRNA-Expression folgender Gene untersucht:

- **SERPING1** Serpin Peptidase Inhibitor G1
- **SERPINF2B** Serpin Peptidase Inhibitor F2B
- **SERPINB1** Serpin Peptidase Inhibitor B1

Der intrazelluläre **PI3K/Aktin Signaltransduktionsweg** ist wichtig für die Regulierung des Zellzyklus und kommt auch bei Fischen vor. PI3K steht hier für Phosphoinositid-3-Kinasen, wobei es sich um Enzyme handelt, deren Aktivität in sämtlichen eukaryotischen Zellen zu finden ist. Sie sind an einer Vielzahl von zellulären Schlüsselfunktionen, wie Zellwachstum, Zellproliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Zelladhäsion beteiligt (<https://www.cellsignal.de>).

Aus diesem Komplex wurde die mRNA-Expression folgender Gene untersucht:

- **INPP5D** Phosphatidylinositol-3,4,4-triphosphate 5-Phosphatase; Negative Regulation des PI3K Signaltransduktionswegs und negativer Regulator des B-Zell Antigen Rezeptor Signalings und negativer Regulator der myeloiden Zell Proliferation

Bei den **intrazellulären Pathogenerkennungszepatoren** handelt es sich um Rezeptoren der Nukleotid bindenden und Oligomerisierenden Domäne (NOD), die eine Schlüsselrolle in der Pathogenerkennung und Aktivierung der Signaltransduktionswege der angeborenen Immunabwehr auch bei Fischen spielen ⁵⁸. Bi et al. 2018 haben gezeigt, dass NOD bei Fischen Lipopolysaccharide von gram-negativen Bakterien erkennt und den NF-κB Signaltransduktionsweg durch Rekrutierung von RIPK2 und anschließender Beeinflussung der Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen.

Aus diesem Komplex wurde die mRNA-Expression folgender Gene untersucht:

- **NODa** "Nukleotid-binding Oligomerisation" Domäne a oder I
- **NODb** "Nukleotid-binding Oligomerisation" Domäne b oder II
- **NLRC3** NOD-like Rezeptor C 3
- **NLRC5** NOD-like Rezeptor C 5

Der **Toll-like Rezeptor Signaltransduktionsweg** ist Teil der angeborenen Immunabwehr und auch bei Fischen an der Erkennung von spezifischen funktionalen Bestandteilen von Viren, Bakterien und Pilzen beteiligt.

Auch bei Fischen wurden verschiedene Toll-like Rezeptoren (TLRs) als spezifische Mustererkennungsmoleküle identifiziert. Von Maus und Mensch weiß man, dass die Stimulation von TLRs zur Aktivierung von NF-κB führt. TLRs sind wichtige Regulatoren sowohl für angeborene als auch für adaptive Immunreaktionen.

Aus diesem Komplex wurde die mRNA-Expression folgender Gene untersucht:

- **TLR20**
- **TLR22α**
- **TLR3**
- **TLR5**
- **TLR9**

Beim **NF-kappa B Signaltransduktionsweg** (NF-κB; „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“) handelt es sich um einen Proteinkomplex, der die Transkription von DNA, Zytokinproduktion und Zellüberleben kontrolliert. Sie wird ihrerseits wieder durch den PI3K/Aktin Signaltransduktionsweg reguliert. Das NF-κB ist in fast allen Tierzelltypen zu finden und ist in zellulären Reaktionen auf Reize wie Stress, Zytokine, freie Radikale, Schwermetalle, ultraviolette Bestrahlung, oxidiertes LDL und bakterielle oder virale Antigene involviert und spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Immunantwort auf Infektionen. Es ist wichtig bei der Regulierung zellulärer Reaktionen, weil es zur Kategorie der "schnell aktivierenden" Primärtranskriptionsfaktoren gehört, d.h. Transkriptionsfaktoren, die in Zellen in einem inaktiven Zustand vorhanden sind und keine neue Proteinsynthese benötigen, um Aktiviert werden (andere Mitglieder dieser Familie sind Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, STATs und zelluläre Hormonrezeptoren). Damit kann NF-κB als erster auf schädliche Zellreize reagieren. Bekannte Induktoren sind sehr variabel und umfassen reaktive Sauerstoffarten (ROS), TNFα, IL1β), bakterielle Lipopolysaccharide, Isoproterenol, Kokain und ionisierende Strahlung. Der Rezeptoraktivator von NF-κB (RANK), der eine Art TNFR ist, ist ein zentraler Aktivator von NF-κB (<https://www.cellsignal.de>).

Aus diesem Komplex wurde die mRNA-Expression folgender Gene untersucht:

- **RIPK2** Rezeptor Interagierendes Protein 2; hierbei handelt es sich um ein Adapter Protein, welches essentiell für die Aktivierung von NF-κB, NOD1 und NOD2 abhängigen Signalwegen ist. Es ist Teil der angeborenen und erworbenen Immunantwortwege. Es induziert Apoptose.
- **IKBA1** NF-κB Inhibitor alpha; Inhibiert die Aktivierung des NF-κB

- **IKBA2** s.o.
- **IKBA3** s.o.
- **USP4** Ubiquitin spezifische Protease 4; Nimmt wichtige Funktion in verschiedenen Signaltransduktionswegen ein → NF-κB, TGFβ, Wnt/b-Catenin, p53 und Splicesosome Signaltransduktionsweg
- **A20** „TNFα induced Protein 3“; Ubiquitin-editiertes Enzym, dass die NF-κB Aktivierung, sowie die TNF vermittelte Apoptose hemmt; involviert in Immunantwort und Antworten auf Entzündungen

Der **MAP-Kinase Signalweg** (MAP, „mitogen-activated protein“) bezeichnet in der Biologie eine Reihe mehrstufiger Signaltransduktionswege, die unter anderem an der Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und des Programmierten Zelltodes beteiligt sind⁵⁹. Die MAP-Kinase-Signalwege umfassen mindestens drei „in Serie“ geschaltete Kinasen: eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP-3K), eine MAP-Kinase-Kinase (MAP-2K) und eine MAP-Kinase (MAP-K), welche in dieser Reihenfolge aktiviert (phosphoryliert) werden.

Aus diesem Komplex wurde die mRNA-Expression folgender Gene untersucht:

- **MAP3K5**
- **MAP3K14**
- **MAP3K1**

Der **JAK-STAT-Signalweg** ist ein Signalübertragungsmechanismus, der zur Regulation der Zellentwicklung, Wachstumskontrolle und Homöostase beiträgt. JAK bedeutet Januskinase und STAT steht für „Signal Transducers and Activators of Transcription“. Der JAK-STAT-Signalweg bietet für eukaryotische Zellen eine Möglichkeit, die Information extrazellulärer Signalpeptide von der Zellmembran intrazellulär zu den Promotoren der Zielgene im Zellkern weiterzuleiten. Die JAKs phosphorylieren und aktivieren die STATs, die dann in den Zellkern geleitet werden und dort als Transkriptionsfaktoren dienen. Der JAK-STAT Signalweg stellt demnach eine direkte Route in den Kern dar und kommt ohne sekundäre Botenstoffe aus.

- **STAT1** Transkriptionsfaktor

2.6.2.2 „Nachgestellte“ Botenstoffe

Zytokine sind kleine Botenmoleküle (Polypeptide oder Glykoproteine), die eine Schlüsselrolle bei der Zellsignalisierung und Modulation der Immunantwort spielen. Sie funktionieren durch autokrine, paracrine und endokrine Signalgebung. Ihre Funktion auf Zielzellen ist vielfältig. Zytokine werden von verschiedenen Zelltypen synthetisiert, z. B. Makrophagen, B-Lymphozyten oder T-Lymphozyten. Zytokine werden als Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF), koloniestimulierende Faktoren (CSF) und Chemokine⁵⁰ klassifiziert. Alle großen Zytokinfamilien gibt es in Fischen, aber oft tauchen mehrere Kopien bestimmter Gene auf⁶⁰.

Aus diesem Komplex wurde die mRNA-Expression folgender Gene untersucht:

- **IL1β** Interleukin 1β Untereinheit wird von Makrophagen und B-Lymphozyten gebildet, und wirkt über mittels des NF-κB Signaltransduktionsweg pro-inflammatorisch. Es ist an der Aktivierung anderer Zytokine, Aktivierung von B- und T-Lymphozyten sowie Natürlichen Killerzellen, der Freisetzung von Prostaglandinen, der Aktivierung der Gerinnungskaskade, u. a. beteiligt. Die Ausschüttung wird durch TNFα stimuliert.
- **IL4/13** Interleukin 4 wird vorwiegend von Th2-Lymphozyten und Mastzellen gebildet. Es fördert bei Mensch und Maus die IgE-Produktion durch Aktivierung von B-Lymphozyten und die Degranulation von Mastzellen. Durch seine hemmende Wirkung auf die Makrophagenfunktion wird es zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gerechnet. Nach Bindung an den Interleukin-4-Rezeptor wird das Signal über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg weitergeleitet.

- **IL6** Interleukin 6 ist bei Forellen ein Differenzierungsfaktor für B-Zellen der IgM-Reaktionen in Abwesenheit von folliculären Strukturen stimuliert ⁶¹.
- **IL8** Interleukin 8 wird insbesondere von Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten synthetisiert. Als Entzündungsmediator (eher beschränkt auf lokale Ereignisse) mobilisiert IL8 durch chemotaktische Stimuli neutrophile Granulozyten und unterstützt ihre Degranulation.
- **IL8-G** Primer, der alle Transkriptvarianten von IL8 misst als Ergänzung zu IL8; bei der Forelle gibt es insgesamt mehr als 11 Varianten von IL8
- **IL10-1** Interleukin 10 wird vor allem von Monozyten, weniger von Th2-Lymphozyten und regulatorischen T-Lymphozyten sezerniert. IL10 spielt eine entscheidende Rolle bei der Modulation eines Entzündungsgeschehens, indem es durch seine anti-inflammatorische Wirkung eine überschießende Immunantwort verhindert. Es hemmt die Produktion von pro-inflammatorischen Faktoren wie Interferon- γ , IL2, IL3, Tumor-Nekrose-Faktor α und GM-CSF durch Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und T-Helferzellen.
- **IL10-2** andere Isoform von IL10
- **IL12** Interleukin 12; wird von Monozyten und Makrophagen synthetisiert. Wichtigste Funktion von IL12 ist die Initiation und Aufrechterhaltung der zur zellulären Abwehr gehörenden Th-1-Immunantwort. Durch diese Form der Einflussnahme auf die eigenen Abwehrmechanismen der Zelle beeinflusst IL12 auch die Intensität und Dauer von intrazellulären Infektionen.
- **IL22** Interleukin 22; Die Expressionsanalyse in Geweben von gesunden Fischen ergab eine höhere konstitutive Expression von IL22 in Schleimhautgewebe, was auf eine potenziell wichtige Rolle bei der mukosalen Immunität hindeutet ⁶².
- **TNF α 2** Tumor-Nekrose-Faktor α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und eines der ersten Gene, die nach einer Infektion exprimiert werden. Damit ist es ein wichtiger Akteur bei der Regulierung der Entzündungsreaktion ⁶⁰. TNF wird von verschiedenen Zelltypen produziert, darunter Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen, Astrozyten und Tumorzellen ⁶³. TNF α in Fischen ist in der Lage, Makrophagen zu aktivieren und die phagozytische Aktivität von Fisch-Leukozyten zu verbessern ^{52,63,64}. In vitro triggert TNF α die Expression von mehreren Immungenen in primären Forellenkopfnieren (HK) Leukozyten und Makrophagen wie IL1 β , IL8, IL17C, TNF α ⁶⁵. TNF wirkt über die Aktivierung der Immunantwort mittels NF- κ B Signaltransduktionsweg.
- **TNF β** auch Lymphotoxin;
- **TGF β 1** „Tumor Growth Faktor β “; Alle Leukozyten-Linien produzieren TGF β 1, z. B. Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Aktiviertes TGF β bildet einen Serine/Threonine Kinase-Komplex der an den Typ I und Typ II TGF β Zelloberflächenrezeptoren bindet und eine Signalkaskade aktiviert, wodurch verschiedene nachgeschaltete Substrate und regulatorischer Proteine aktiviert, die Transkription verschiedener Zielgene induzierend und Differenzierung, Chemotaxis, Proliferation und Aktivierung vieler Immunzellen reguliert wird ⁶⁶. TGF β hemmt die Vermehrung von T-Zellen und zytotoxischen T-Zellen und die Expression von Immunoglobulin G und der Immunoglobulin M (IgM), dem Major Histocompatibility Complex, Fc- und IL2 Rezeptor und deaktiviert Makrophagen ^{60,67,68}. Neben diesen anti-inflammatorischen, immunhemmenden Effekten hat TGF β auch Entzündungsfördernde Effekte indem es die Chemotaxis von Makrophagen und Neutrophilen und die Th17-Differenzierung fördert und die IgA-Sekretion in B-Zellen und Produktion einiger Zytokine stimuliert ^{60,67}.
- **TGF β 2** andere Isoform
- **SOCS1** Suppressor des Zytokin Signalings 1; Zytokin induzierte negative Regulatoren des Zytokin Signalwegs; induziert durch IFN γ , GM-CSF, IL3, IL2
- **IFN γ 2** Interferon gamma2

Chemokine, sind eine Gruppe der Zytokine und spielen eine zentrale Rolle bei der Migration von Immunzellen im Gewebe und bei deren Auswanderung aus dem Blut. Manche Chemokine wirken zusätzlich aktivierend auf Immunzellen, und einige sind an der Organentwicklung und der Angiogenese beteiligt. Die ungefähr 50 unterschiedlichen Chemokine werden auch bei Fischen von Immunzellen und vielen Gewebezellen produziert. Ihre Wirkung entfalten sie nach Bindung an Chemokinrezeptoren, die im Immunsystem weit verbreitet sind ⁶⁹.

Aus diesem Komplex wurde die mRNA-Expression folgender Gene untersucht:

- **CCL4** CC Motiv Chemokine Ligand 4; Hierbei handelt es sich um ein Monokine mit entzündungsfördernden und chemokinetischen Funktionen. Seine Wirkung entfaltet CCL4 durch Aktivierung sowohl des Aktin- als auch des NF- κ B Signaltransduktionsweges (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCL4>).
- **CXCL12** CXC Motiv Chemokin Ligand 12 auch „stromal cell-derived factor 1“ ist ein körpereigener Botenstoff aus der Gruppe der CXC-Motiv-Chemokine. Als chemotaktisch wirkendes Zytokin spielt dieses Peptid eine Schlüsselrolle bei der Organ- und Wundheilung und ist an Entzündungsprozessen beteiligt. CXCL12 wird von Leberzellen gebildet und ins Blut freigesetzt ⁷⁰.
- **CXCL14** CXC Motiv Chemokin Ligand 14 ist chemotaktisch für Monozyten und kann diese unter Beteiligung von Prostaglandin E2 aktivieren. Darüber hinaus stimuliert es die Aktivierung von dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen ⁷¹⁻⁷³.
- **CXCL8** CXC Motiv Chemokin Ligand 8 entspricht IL8. Bei Fischen gibt es viele verschiedene Isoformen.
- **Forellenspezifisches CC-Protein/ Chemokin**

Die **Akute-Phase-Reaktion** ist eine Allgemeinreaktion des Körpers im Rahmen einer Entzündung. Die Akute-Phase-Reaktion wird durch Zytokine wie IL1, IL6, Interferon γ , TNF α , TGF β , LIF und EGF ausgelöst. Sie beinhaltet vor allem Fieber, Leukozytose und die Produktion von Akute-Phase-Proteinen (APP), vor allem von C-reaktivem Protein. Die Zytokine gelangen mit der Blutzirkulation in die Leber. Dort regen sie zusammen mit Cortisol die Leberzellen zur Produktion von etwa 30 verschiedenen Akute-Phase-Proteinen an. Akute-Phase-Proteine fördern die Wundheilungsprozesse und reduzieren das Ausmaß der Gewebeschädigung. Sie sind daher wichtige diagnostische Marker. C-reaktives Protein kommt z. B. normalerweise nur in Spuren im Blutplasma vor. Wenn eine Entzündung vorliegt, kann der Wert bis auf das 1.000 fache steigen.

Aus diesem Komplex wurde die mRNA-Expression folgender Gene untersucht:

- **HP** Haptoglobin
- **SAA** Serum Amyloid A; rekrutiert Immunzellen
- **TCBP1-1**
- **TCBP2**
- **A2M** alpha-2-Makromolekül \rightarrow hemmt alle vier Klassen von Proteinasen und ist ein Zytokin Transporter, kann inflammatorische Zytokine inhibieren und damit Entzündungskaskaden unterbrechen; zu den mit A2M verbunden Signalwegen gehört die Komplement und Koagulationskaskade und der IL6-vermittelte Signaltransduktionsweg
- **FTH** „Ferritin Heavy Chain 1“, auch Apoferritin; Haupt-Eisenspeicherndes Protein in Pro- und Eukaryonten in einer nicht toxischen Art und Weise.

Hitzeschockproteine („heat shock protein“, HSP) sind Proteine, die anderen Proteinen bei der Faltung oder bei der Erhaltung ihrer Sekundärstruktur unter Extrembedingungen helfen. Sie werden in erhöhtem Maße gebildet, nachdem Zellen Hitze oder anderen Arten von belastenden Umwelteinflüssen wie Ultraviolettstrahlung, Schwermetallen oder Ethanol ausgesetzt wurden. In diesen Situationen zellulären Stresses stabilisieren

Hitzeschockproteine zelluläre Proteine, um sie vor Denaturierung zu schützen oder beschleunigen den Abbau nicht mehr funktionsfähiger Proteine über das Proteasom.

Aus diesem Komplex wurde die mRNA-Expression folgender Gene untersucht:

- **HSP 30**
- **HSP 47 α**
- **HSP 47 β**
- **HSP90AA1 α**
- **HSP90AA1 β**

Als **Komplement und Koagulations-Kaskaden Signalkette** wird die kaskadenartige proteolytische Aktivierung der Gerinnungsfaktoren innerhalb der plasmatischen Gerinnung bezeichnet. Die kann auf unterschiedliche Arten aktiviert werden.

Aus diesem Komplex wurde die mRNA-Expression folgender Gene untersucht:

- **C1q** Komplement Komponente 1 q Subkomponente
- **C1r/s** Komplement Komponente 1 r/s Subkomponente
- **C3-1** Komplement Komponente 3 Primervariante 1
- **C3-4** Komplement Komponente 3 Primervariante 4
- **C7-1** Komplement Komponente 7 Primervariante 1
- **C7-2** Komplement Komponente 7 Primervariante 2
- **CD59** „Cluster of differentiation antigen 59“; inhibiert den „membran attack“ Komplex, ist speziesspezifisch und in die T-Zell Aktivierung involviert
- **FGL2** „Fibrinogen like protein 2“; dieses Protein ist ähnlich der beta- und gamma Kette von Fibrinogen. Seine Signalkaskade bezieht sich auf das angeborene Immunsystem.
- **C3 α R** C3a Rezeptor
- **C5 α R** C5a Rezeptor
- **CFI** Komplementfaktor I
- **CFD** Adipsin, Komplementfaktor D
- **PRF** Perforin 1; dieses Gen kodiert ein Protein mit strukturellen Ähnlichkeiten zur Komplement Komponente C9, die für die Immunität wichtig ist. Es bildet Membranporen, die die Freisetzung von Granzymen und die anschließende Zytolyse der Zielzellen ermöglichen.
- **CFH** Komplementfaktor H;

Marker zur Darstellung bestimmter Zellpopulationen oder Pathogen. Sie werden von den unterschiedlichen Zellpopulationen verstärkt ausgeschüttet, wenn diese vermehrt auftreten, also proliferieren.

Thrombozytenmarker

- **CD41** Integrin alpha 2b; Das kodierte Preproprotein wird proteolytisch verarbeitet, um eine leichte und eine schwere Ketten zu erzeugen, die assoziiert durch eine Disulfid-Verbindungen die Untereinheit des alpha-IIb/beta-3-Integrin-Zellbindungs Rezeptors bilden. Dieser Rezeptor spielt eine entscheidende Rolle im Blutgerinnungssystem, indem er die Aggregation der Blutplättchen vermittelt.

T-Zell-Marker

- **TCRB** T-Zell Rezeptor

B-Zell-Marker

- **IgM** Immunglobulin M; Von B-Zellen sezerniert, IgM hat eine Funktion als frühestes im Verlauf einer Immunantwort produziertes Immunglobulin zur Aktivierung des Komplementsystems, weshalb ein erhöhter IgM-Antikörperwert bei einer Blutuntersuchung auf eine aktuelle Immunantwort – also eine momentane Infektion – hindeutet.

Granulozyten- und Makrophagen-Marker

- **G-CSFR** der „Colony Stimulating Factor 3“ Rezeptor ist der Rezeptor für ein Zytokin, welches die Produktion, Differenzierung und Funktion von Granulozyten kontrolliert.

- **M-CSFR** „Makrophage Colony Stimulating Factor“ I Rezeptor; Rezeptor für ein Zytokin, welches die Produktion, Differenzierung und Funktion von Makrophagen kontrolliert. Es handelt sich hier um einen Tyrosinkinase Transmembran Rezeptor und Teil der CSF1/PDGF Rezeptor Familie der Tyrosinkinasen. Fördert die Freisetzung von pro-inflammatorischen Chemokinen als Reaktion auf IL34 und CSF1 und spielt damit eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität und bei entzündlichen Prozessen.
- **LYG1** Lysozym G1; Lysosomale Aktivität; Teil des angeborenen Immunsystems; Beim Menschen sind unter physiologischen Bedingungen etwa 80 % des Lysozyms im Blutplasma auf den Abbau von neutrophilen Granulozyten zurückzuführen⁷⁴. Monozyten und Makrophagen können Lysozym aktiv sezernieren. Lysozym ist ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems und dient der Abwehr von Bakterien.
- **LYG2** Lysozym G2
- **LYG3** Lysozym G3

Virusinfektionen

- **MX1** Myxovirus 1 Gen; Interferon-induzierte Dynamine-like GTPase mit antiviraler Aktivität gegen zahlreiche RNA und manche DNA Viren, Eingesetzt zum Nachweis von vorliegenden Virusinfektionen

Nicht spezifischer klassifizierbare Gene, welche *an Entzündungsreaktionen beteiligt sind*:

- **GPR84** G-Protein gebundener Rezeptor 84; Rezeptor für mittellange freie Fettsäuren, Aktivierung des G(i/o) Protein Signalwege; könnte eine wichtige Rolle bei Prozessen des Fettsäuremetabolismus in Zusammenhang mit dem Immunsystem spielen
- **SOD1** Superoxid Dismutase 1; Bindet Kupfer und Zink Ionen und zerstört auf diese Weise Superoxid Radikale im Körper
- **SOD2** Superoxid Dismutase 2;
- **MPO** Myeloperoxidase; Regulation und Termination von Entzündungsprozessen, in neutrophilen Granulozyten
- **NCCRP1** „Non-specific cytotoxic cell receptor protein 1“; fördert die Zellproliferation
- **NOS2** Stickstoffmonoxid-Synthase; wirkt als freies Radikal, und ist an Autoimmunreaktionen beteiligt
- **PPARG** Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren gamma; aktiviert Peroxisomen und P450 Gene
- **PSMB7** „Proteasome subunit beta type- 7 precursor“; reguliert gamma Interferon herunter
- **UCP2** „Mitochondrial uncoupling protein 2“; metabolischer Regulator
- **UCP4** andere Primervariante
- **ENPP3** Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3; Dieses Ektoenzym ist an der Hydrolyse extrazellulärer Nukleotide beteiligt. Diese Ektoenzyme weisen ATPase und ATP Pyrophosphatase Aktivitäten auf und sind Transmembran-Proteine vom Typ II. Immature Gliazellen und Zellen des Verdauungstraktes produzieren dieses Gen.

Ob diese bisher in teilweise anderen Zusammenhängen untersuchten/ stehenden Gene auch eine Rolle im Zusammenhang mit Stress spielen und als potentielle Stressmarker in Frage kommen, wurde in diesem Projekt näher betrachtet.

Darüber hinaus wurden „traditionelle“ Stressmarker zur Beurteilung von Stress wie Cortisol, Hämatokrit, Differenzialblutbild, Wachstums- und Performance-Leistungen der Forellen vergleichend untersucht.

3 Material und Methoden

Zunächst werden die allgemeinen Methoden, welche für beide durchgeführten Versuche gelten, genannt.

3.1 Probennahme

Die Blutentnahme erfolgte tierschutzgerecht unter Betäubung durch einen Schlag auf den Kopf. Nach der Betäubung erfolgte die Blutentnahme durch Punktion der Kaudalvene (*Vena caudalis*), wobei der Einstich der Kanüle in einem ca. 45 ° Winkel in der Medianen im Schwanzbereich des Fisches erfolgte. Für die Blutentnahme wurden sterile 1,2 mL EDTAMonovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) und sterile Einmalkanülen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Die benötigte Zeit vom Fang der Fische mit direkter Betäubung bis zum Ende der Blutentnahme wurde dokumentiert und betrug maximal fünf Minuten, im Mittel 2,5 Minuten. Im Anschluss wurden die Blutproben zur Ermittlung des Hämatokrits, des Cortisolgehaltes und der prozentualen Blutzellzusammensetzung weiter bearbeitet. Um eine Beeinflussung des Cortisolgehaltes durch die circadiane Rhythmik der Cortisolausschüttung auszuschließen, wurden die gehaltenen Fische immer zur gleichen Tageszeit (zwischen 9:00 und 10:30 Uhr beim indoor Sojafütterungsversuch, Büsum und zwischen 15:00 und 16:00 Uhr beim outdoor Haltungsversuch, Starnberg) beprobt.

Nach der Blutentnahme wurden die Fische durch einen weiteren Schlag auf den Kopf tierschutzgerecht getötet und ein Kiemenrundschnitt wurde durchgeführt. Es wurden die Gesamtlänge, das Gesamtgewicht, sowie das Gewicht der Milz und Leber (nur beim Vorversuch) ermittelt.

Die Beprobung der Forellen wurde entsprechend des § 7 Abs. 2 Satz 3 des geänderten und novellierten Tierschutzgesetzes (28. Juli 2014) durchgeführt und gemäß § 1 Abs. 1 Satz 2 der Versuchstiermeldeverordnung vom 12. Dezember 2013 zum laufenden Kalenderjahr gemeldet.

3.2 Bestimmung der Wachstums- und Performanceleistung

Zur Einschätzung der spezifischen Wachstumsrate (SWR) und der Futtermittelverwertung (FQ) wurden im Abstand von zwei Wochen Gruppenwägungen durchgeführt. Einzig bei der Anfangs- und Endwägung wurden die Fische zwei Tage zuvor genüchert. Zusätzlich wurden die mittlere tägliche Futteraufnahme (Daily feed intake, DFI), der Fulton'sche Konditionsfaktor (K), der Hepatosomatische Index (HSI) und der Splenosomatische Index (SSI) mit Hilfe der täglich erfassten Pelletaufnahme und der bei der Probennahme ermittelten biometrischen Daten berechnet. Die Wachstumsleistung und Performanceleistung wurden anhand der folgenden Formeln 1 bis 6 bestimmt:

$$\text{SWR} \left[\frac{\% \text{ der Biomasse}}{d} \right] = \frac{(\ln(\text{Endgewicht})[\text{kg}] - \ln(\text{Anfangsgewicht})[\text{kg}])}{\text{Fütterungstage}} \cdot 100 \% \quad [1]$$

$$\text{FQ} \left[\frac{\text{kg}}{\text{kg}} \right] = \frac{\text{verfütterte Futtermenge} [\text{kg}]}{(\text{Endgewicht} [\text{kg}] - \text{Anfangsgewicht} [\text{kg}])} \quad [2]$$

$$\text{DFI} \left[\frac{\% \text{ der Biomasse}}{d} \right] = \text{SWR} \cdot \text{FQ} \quad [3]$$

$$K = \frac{\text{Individuelles Endgewicht} [\text{g}]}{(\text{Individuelles Endlänge} [\text{cm}])^3} \cdot 100 \quad [4]$$

$$\text{HSI} [\%] = \frac{\text{Lebergewicht} [\text{g}]}{\text{Individuelles Endgewicht} [\text{g}]} \cdot 100 \quad [5]$$

$$\text{SSI} [\%] = \frac{\text{Milzgewicht} [\text{g}]}{\text{Individuelles Endgewicht} [\text{g}]} \cdot 100 \quad [6]$$

3.3 Blutuntersuchung

3.3.1 Bestimmung des Hämatokritwertes (Hkt)

Das entnommene EDTA-Vollblut wurde direkt nach der Probenname in je drei heparinisierte Mikro-Hämatokrit-Kapillare (Art. Nr. 7493 11, Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland) zu ca. 75 % gefüllt und mit einer Hämatokritzentrifuge (Hämatokrit 210, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) bei 1523 x g für 4 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Anschließend wurde der Hämatokritwert an einer Meßschablone (Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) abgelesen.

3.3.2 Differentialblutbild

Zur hämatologischen Beurteilung der Blutzellen wurde ein Blutausstrich angefertigt. Dazu wurde ein Tropfen EDTA-Vollblut auf einem zuvor gereinigten Objektträger aufgebracht und mit der schmalen Kante eines zweiten Objektträgers verstrichen. Die Blutausstriche wurden luftgetrocknet und anschließend mit einer Giemsa-Färbung (Dip Quick Stain, Jorgensen Laboratories, Loveland; Colorado) gefärbt. Die angefärbten Blutzellen wurden bei 100-facher Vergrößerung mittels Ölimmersion lichtmikroskopisch (CKX41, Olympus, Tokyo, Japan) ausgezählt. Die Auszählung des Blutausstriches erfolgte dabei mäanderförmig. Pro Ausstrich wurden an zwei verschiedenen geeigneten Stellen des Objektträgers jeweils 100 Zellen (Granulozyten, Lymphozyten Thrombozyten und Monozyten) detektiert. Aus dem relativen Anteil der detektierten Blutzellen wurde nachfolgend die prozentuale Zusammensetzung des Differenzialblutbildes abgeleitet.

3.3.3 Bestimmungen des Cortisolgehaltes mittels ELISA

Die quantitative Bestimmung des freien Cortisols im Blutplasma der Forellen erfolgte mittels eines kompetitiven Enzymimmuntests (ELISA). Bei dieser Methode konkurriert die unbekannte Menge Cortisol (Antigen) mit einer bekannten Menge an enzymmarkierten Antigen (E-Ag) um die Bindestellen des an die wells der Mikrotiterplatte gebundenen Antikörpers. Nicht gebundene Antikörper werden nach kurzer Inkubationszeit durch Waschen entfernt (IBL 2015). Durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) wird eine enzymatische Farbreaktion induziert. Hierbei wird das farblose TMB von dem enzymmarkierten Antigen unter Abspaltung von Wasserstoffperoxid abgebaut, wodurch es eine dunkelblaue Färbung zeigt. Nach kurzer Reaktionszeit wird der enzymatische Abbau durch die Zugabe von 1 M Schwefelsäure gestoppt. Auf Grund des veränderten pH-Wertes

schlägt die Farbe des TMB von blau zu einem gelben Farbniederschlag um. Die Intensität der hierbei gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zur Cortisol-Konzentration in der Probe (Reineke 2004).

Für die Bestimmung des Cortisolgehaltes im Blutplasma wurde ein kommerzielles Testkit für Cortisol im humanen Speichel verwendet (Cortisol Salvia Elisa, RE52611, IBL International GmbH, Hamburg Deutschland). Die Testdurchführung erfolgte in Doppelbestimmung nach Herstellerangaben. Für die Messung der optischen Dichte wurde ein Mikroplattenleser (Infinite M200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) verwendet. Die erhaltene optische Dichte wurde mithilfe der Logit-Log-Berechnung linearisiert, da die Abnahme der optischen Dichte nicht linear mit der Zunahme des Cortisolgehaltes erfolgte. Die Auswertung wurde mit der Tabellenkalkulationssoftware Excel 2007 durchgeführt.

3.4 Histologische Untersuchung

Es wurde ein jeweils 1,0 cm x 1,0 cm x 1,0 cm großes Hautstück unterhalb der Rückenflossen, direkt über der Seitenlinie entnommen und zusammen mit einem Stück Leber, einem Stück Milz und zwei Stücke Darm (Vorder- und Enddarm) mittels 4 % gepuffertem Formalin fixiert, in Paraffin gegossen und es wurden anschließend 2 µm dünnen Schnitte angefertigt, die mit Hämatoxylin und Eosin nach einem Standardprotokoll gefärbt wurden. Die Auswertung erfolgte mittels des Primo Star von Zeiss. Die Schnitte wurden auf pathologisch-histologische Auffälligkeiten hin beurteilt. Zur Auswertung des Einflusses von SBM auf den Darm wurde ein Bewertungsindex entwickelt. Ansonsten wurde in erster Linie auf Hinweise von Stress wie vermehrte Ansammlungen von Melanomakrophagen oder Anzeichen von Erkrankungen hin untersucht.

Die Darmgewebeschnitte wurden lichtmikroskopisch ausgewertet, wobei der Schwerpunkt auf den charakteristischen morphologischen Veränderungen der durch SBM induzierten Enteritis (SBMIE) bei Atlantischem Lachs nach Elvis Chikwati, Uni Oslo u. a. ^{75,76} lag. Es wurden Veränderungen der Schleimhautfaltenlänge, -breite und der Zellularität der Submukosa und der Lamina propria ausgewertet. Die supranukleäre Enterozytenvakuolisierung, sowie die Häufigkeit intraepithelialer Lymphozyten, mitotischer Figuren und apoptotischer Körper innerhalb der Epithelschicht wurden beurteilt. Der Grad der Veränderung für die verschiedenen bewerteten morphologischen Merkmale wurde mit Hilfe eines Bewertungssystems mit einer Skala von 0 - 4 bewertet, wobei 0, normal darstellte; 1, leichte Veränderungen; 2, moderate Veränderungen; 3, starke Veränderungen und 4, schwere Veränderungen.

Die histologische Auswertung wurde blind durchgeführt. Die Zuordnung der Einzelproben zu den Versuchsgruppen erfolgte erst nach Abschluss der Auswertung.

Unterschiede in den histologischen Werten für die verschiedenen bewerteten morphologischen Eigenschaften des Gewebes wurden mit dem Fisher-Test auf statistische Signifikanz analysiert. Die Post-Hoc-Analyse für signifikante Fisher Exact Testergebnisse wurde mit dem Chisq post hoc-Test durchgeführt. Beide statistischen Tests wurden im R-Statistik-Paket (Version 3.4.2; 2017) innerhalb der RStudio-Interphase (Version 1.1.383; 2017) durchgeführt. Die Unterschiede wurden unter $p \leq 0,05$ als signifikant erachtet.

3.5 Molekularbiologische Untersuchung

Zur Untersuchung verschiedener potentieller Stress-Marker Gene wurde eine Vielzahl an Genen untersucht, für die jeweils spezifisch für die Forelle Exon-Exon überspannende Primer durch Dr. Alexander Rebl vom Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Institut für Genombiologie, Abteilung Fischgenetik oder von Dr. Henrike Seibel, GMA mittels entsprechender Software (z. B. Primer3©, NCBI Datenbank, Spidey©) entworfen wurden. Diese wurden jeweils zunächst auf ihre Funktion getestet und anschließend auf Unterschiede zwischen den Fütterungs- bzw. Haltungsgruppen.

Die in RNAlater konservierten Blutproben wurden dazu bearbeitet. Die RNA Isolierung aus Blutproben erfolgte modifiziert nach Qiagen® 2014 in einer Kombination der Kits QIAGEN

RNeasy Plus Minikit (QIAGEN, Deutschland) und RiboPure™-Blood Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Es wurden zusätzliche DNase Schritte (enzymatischer Verdau der DNA) eingefügt. Die isolierte RNA Konzentration wurde mittels eines Photometers bestimmt und auf 10 ng/ µl eingestellt.

Es konnte in Kooperation mit dem Leibniz Institut für Nutztierbiologie, Institut Genombiologie, Abteilung Fischgenetik eine Vielzahl an potentiellen Stressmarker-Kandidaten auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zunächst mittels des Fluidigm Biomark HD-System ⁷⁷ überprüft werden. Zur Findung geeigneter Kandidaten wurden mittels Fluidigm nur die Proben aus dem Vorversuch/ Fütterungsversuch mit unterschiedlichen Konzentrationen von Sojabohnenmehl untersucht. Bei dem Fluidigm handelt es sich um ein mikrofluidales System, dass in einem Schritt die mRNA Expression mittels PCR von multiplen Genen aus derselben Probe messen kann. Das Fluidigm-System besteht aus dem Biomark und einem IFC-Controllern für den 48 x 48-Assay. Der Biomark ist ein hochperformantes Echtzeit-PCR-Instrument, das speziell entwickelte Mikrofluid-Chips verwendet.

Einzelne Proben wurden mittels Light Cycler qPCR Technik nachgemessen. Die isolierte RNA wurde dazu in die komplementäre DNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese wurde mit dem Quanti Nova Reverse Transkription Kit (QIAGEN, Deutschland) durchgeführt. Auch hier wurde ein zusätzlicher DNase Verdau eingebaut. Die qRT-PCR wurde mit dem QuantiNova SYBR® PCR Kit (Qiagen, Deutschland) und dem Aria Mx Real-Time-PCR-System (Agilent Technologies, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Fluoreszenz Farbstoff wurde SYBR® Green verwendet, ROX diente als Referenz. Die Untersuchung wurde in Duplikaten durchgeführt und es wurde jeweils eine Standardreihe als Referenz mitgeführt, sowie eine Schmelzkurve angelegt.

Die Auswertung erfolgte nach Vandesompele und Bustin ^{53,78,79} unter Berücksichtigung der Methode mittels Standardkurve ⁸⁰ und der $\Delta\Delta C_t$ Methode ^{78,81}, wobei die qPCR-Spezifität durch den Vergleich von Schmelzkurven und T_m-Werten zwischen den Proben erreicht wurde. Zur Beurteilung der Stabilität der Referenzgenexpression wurden gNorm und NormFinder verwendet ⁸². Das geometrische Mittel von drei stabil exprimierten Referenzgenen wurde berechnet, um Genexpressionsdaten zu normalisieren, um Unterschiede in der Stoffwechselaktivität und damit Unterschiede im Expressionsniveau der Proben auszugleichen. Zunächst wurde dazu für jede Stichprobe der Quotient aus der Stichprobennummer und dem Mittelwert für alle Stichprobenzahlen ermittelt. Ein Normierungsfaktor für jede Probe wurde durch Berechnung des geometrischen Mittelwertes des Quotienten der drei HKGs bestimmt. Die Rohkopiennummern für jede Probe wurden mit dem Normierungsfaktor multipliziert, um normalisierte Kopienzahlen zu erhalten. Um Abweichungen zwischen verschiedenen qPCR-Läufen zu minimieren, wurden alle Daten für ein Gen von Interesse mittels Multiplattenanalyse zusammengefasst (Mx 1.0, Agilent Technologies, USA). Der Schwellenwert wurde gemäß dem Hintergrund-Schwellenalgorithmus individuell auf den gleichen Pegel eingestellt und die Standardreihen lagen dadurch in 6-fach Messung vor.

3.6 Vorversuch, Fütterungsversuch

Abbildung 1 stellt den Vorversuch schematisch dar.

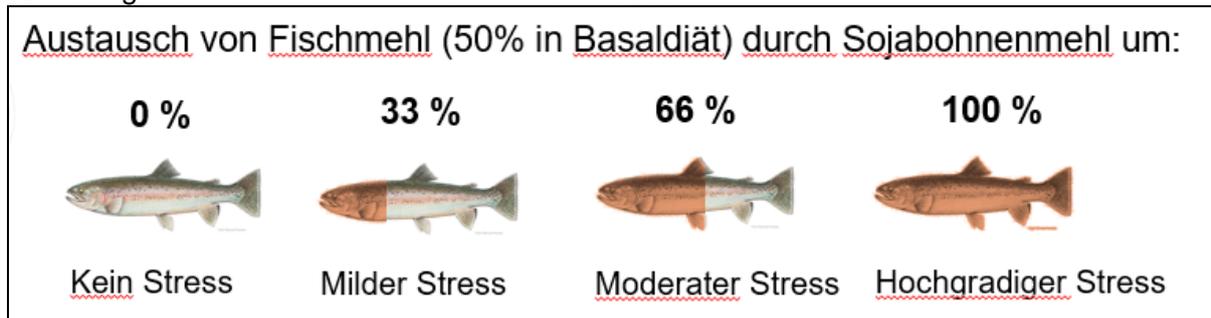


Abbildung 1 Einfaktorieller Fütterungsversuch mit 3 unterschiedlich hohen Mengen an Soja-Protein im Futtermittel, 33 %, 66 % und 100 % (im Folgenden SBM33, resp. SBM66 oder SBM100) und eine Kontrolldiät (im Folgenden CD).

Die Stress-Studie wurde in der Versuchsanlage der Gesellschaft für Marine Aquakultur mbH (GMA) in Büsum, Deutschland durchgeführt. Hierfür wurden 280 juvenile weibliche Monosex-Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) verwendet, die aus der Forellenzucht Troststadt GbR in Reurieth, Deutschland stammten. Der Versuch wurde in Triplikaten mit jeweils 17 Fischen pro Becken angelegt. Die Anfangsbesatzdichte betrug 4-5 kg/m³, bei einem durchschnittlichen Fischgewicht von 70-80 g. Für einen Zeitraum von zwei Wochen wurden die Versuchstiere an die Haltungsbedingungen adaptiert, wobei sie mit einem kommerziellen Fischfutter (Aller Platinum, Aller Aqua, Golßen, Deutschland) auf Erhalt gefüttert wurden. Im anschließenden achtwöchigen Versuchsverlauf wurden die Triplikate Fischgruppen (81,85 ± 0,35 g) zweimal täglich (9:00 Uhr / 16:00 Uhr) bis zur scheinbaren Sättigung mit je einem der vier Versuchsfuttermittel gefüttert. Nach jeder Fütterung wurden die am Boden liegenden Pellets abgesaugt und gezählt, um die tatsächliche Futteraufnahme zu berechnen.

Als Haltungseinrichtung stand eine Kreislaufanlage (Spranger Kunststoffe, Plauen, Deutschland), aus 10 Becken mit jeweils 300 L Haltungsvolumen und einem Gesamtvolumen von ca. 5 m³, zur Verfügung. Die Haltungsbecken wurden durch eine Trennwand in zwei gleichgroße Bereiche separiert, so dass 20 Becken mit 150 L Haltungsvolumen verwendet werden konnten. Das transparente Schauenfenster der Becken wurde mit einer Spiegelsplionfolie (ESG Handels GmbH, Leutasch, Österreich) beklebt, damit die Fische so wenig wie möglich durch Routinearbeiten an der Anlage beeinträchtigt wurden. Die Sauerstoffversorgung erfolgte über ein Belüftungssystem direkt in den Haltungsbecken. Zusätzlich wurde das Wasser im Pumpensumpf über einen Luftausströmer mit Sauerstoff angereichert. Für die Wasseraufbereitung standen der rezirkulierenden Aquarienwand ein 55 Watt UV-C Strahler (Pro Clear, TMC, Chorleywood, England), ein Abschäumer (Turboflotter Blue 3000, Aqua Medic GmbH, Bissendorf, Deutschland), ein Schwammfilter aus Polyurethanschaumstoff zur mechanischen Reinigung, ein belüfteter Bewegtbett-Filter mit 120 L Biocarrier, sowie ein Polygeyser Beadfilter (Model DF-6, Aquaculture Systems Technologies, LLC., New Orleans, Los Angeles) als mechanische und biologische Reinigungseinheit zur Verfügung. Die Wassertemperatur wurde mittels eines Wärmetauschers (TSC 510, Behncke GmbH, Hannover, Deutschland) auf ca. 18 °C geregelt. Das Lichtregime wurde durch eine Wochenzeitschaltuhr (EG 103, Hager, Blieskastel, Deutschland) auf einen 14 : 10 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus eingestellt.

Es wurden vier isonitrogene (54,69 ± 0,49 %) und isoenergetische (22,23 ± 0,14 MJ/kg) Versuchsfuttermittelmischungen formuliert. Als Referenzfuttermittel diente die Kontroll-Diät (control diet CD), bei der Fischmehl als Hautproteinquelle eingesetzt wurde. Bei den übrigen drei Futtermitteln wurde der Fischmehlanteil zu 33 %, 66 % und 100 % durch Sojabohnenmehl (SBM: bezeichnet als SBM33, SBM66 und SBM100) ausgetauscht. Die Futtermittelrezepturen wurden so konzipiert, dass der Aminosäurebedarf von Regenbogenforellen basierend auf dem Aminosäuregehalt der verwendeten Rohstoffe rechnerisch gedeckt ist (NRC 2011). Die Inhaltsstoffe und Zusammensetzungen der

Versuchsfuttermittel sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Ergebnisse der mittels Weender Analyse ermittelten Nährstoffzusammensetzungen können bei Bedarf bereitgestellt werden. Am Ende wurde eine Futtermittel- und Ganzkörperanalyse durchgeführt.

Nach der Initialbeprobung zum Versuchsstart, erfolgte nach 4 Wochen Versuchslaufzeit eine Zwischenbeprobung, sowie eine Abschlussbeprobung nach acht Wochen, wobei jeweils zwei Fische pro Versuchsbecken, damit sechs Forellen pro Fütterungsgruppe, untersucht wurden. Es wurden Länge und Gewicht bestimmt, Blutproben für die Bestimmung von Hämatokrit, des Differentialblutbildes, Cortisol und molekularer Marker, sowie die Gewichte von Milz und Leber und Organproben zur histologischen Untersuchung entnommen. Zur Durchführung und Weiterbearbeitung siehe Kapitel 3.1 bis 3.5.

Tabelle 1 Inhaltsstoffe und Zusammensetzung der im Fütterungsversuch eingesetzten Futtermittel. CD = Kontrolldiät; SBM = Sojabohnenmehl; 33, 66 und 100 = Prozentanteil zu dem die 50% Fischmehl aus der CD gegen Sojabohnenmehl ausgetauscht wurden.

Futtermittelkomponente	CD [%]	SBM33 [%]	SBM66 [%]	SBM100 [%]
Fischmehl ¹	50,00	33,50	17,00	0,00
Sojabohnenmehl ²	0,00	16,40	33,00	50,00
Blutmehl ³	5,00	5,00	5,00	5,00
Gelatine ⁴	3,00	3,00	3,00	3,00
Erbsenproteinisolat ⁵	6,50	6,50	6,50	6,50
Weizengluten ⁶	7,00	10,59	14,05	17,25
Weizenstärke ⁷	19,50	15,00	10,55	5,50
Fischöl ⁸	8,00	8,55	9,05	10,03
Vitamin-Mineralmischung (1:1) ⁹	0,50	0,50	0,50	0,50
Kaolin ¹⁰	0,00	0,47	0,85	1,22
Calciumhydrogenphosphat ¹¹	0,50	0,50	0,50	0,50
Biolys ¹²	0,00	0,00	0,00	0,50

¹ Fischmehl: Seelöwe, Heringsfischmehl, 68 % Rohprotein, 10 % Rohprotein, Bioceval GmbH & Co. KG, Cuxhaven, Deutschland

² Sojamehl 200: P.C. Van Tuijl Kesteren B.V., Kesteren, Holland

³ Blutmehl: Schweine Blutmehl 90, Sonac, Burgum, Niederlande

⁴ Gelatine: Speisegelatine gold, Gustav Ehlerl GmbH & Co. KG, Verl, Deutschland

⁵ Erbsenproteinisolat: Erbsenproteinisolat Empro E 86, Emsland Group, Emlichheim, Deutschland

⁶ Weizenquellstärke: Type 90 Kröner Stärke, Ibbenbüren, Deutschland

⁷ Weizengluten vital: Kröner Stärke, Ibbenbüren, Deutschland

⁸ Fischöl: Vereinigte Fischmehlwerke Cuxhaven GmbH & Co. KG, Cuxhaven, Deutschland

⁹ Vitamin-Mineralmischung: 517158, Vitfoss, Grasten, Dänemark

¹⁰ Kaolin: Sibelco, Ransbach-Baumbach, Deutschland

¹¹ Calciumhydrogenphosphat (CaHPO₄): JRS Pharma GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland

¹² Biolys: Evonik Industries AG, Essen, Deutschland

3.7 Praxisversuch, Haltungsveruch

Der Praxisversuch wurde zwischen dem 01.02.2017 und 27.04.2017 durch den Kooperationspartner, das Institut für Fischerei der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Starnberg durchgeführt. Abbildung 2 zeigt schematischen den Versuchsaufbau.

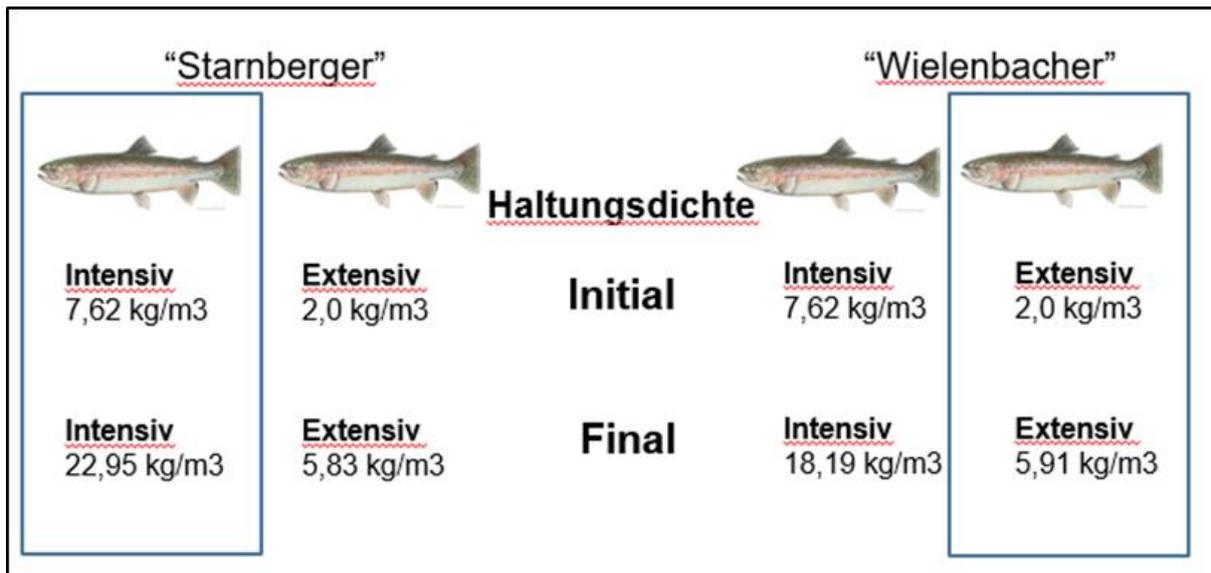


Abbildung 2 *Haltungsversuch mit jeweils verschiedenen Forellenherkünften aus extensiver („Wielenbacher“) und intensiver („Starnberger“) Erzeugung, die jeweils in ökologisch intensiver und extensiver Haltungsdichte gehalten werden.*

Für das Experiment wurden vier Freiluft-Teichsysteme, Erdteiche mit Schotterbetten und Quellwasserspeisung eingesetzt. Die Zuflussrate lag zwischen 3,0 L/ sec und 3,6 L/ sec und wurde so eingestellt, dass der Prozentanteil an Sauerstoff, wie nach EU Bio Vorgaben vorgeschrieben immer über 60 % lag. Lagen die Werte in/unter diesem Bereich wurde mit zusätzlicher Belüftung bzw. Erhöhung des Zulaufs reagiert.

Es wurden Regenbogenforellen aus Starnberg mit Regenbogenforellen aus Wielenbach verglichen. Während die Starnberger-Forellen unter den Versuchsbedingungen gezüchtet und gehalten wurden, mussten sich die Wielenbacher-Forellen erst an die Verhältnisse in Starnberg adaptieren. Anschließend wurden die zwei Herkünfte in eine nach der Öko-VO intensiven und extensiven Besatzdichte aufgeteilt. Die anfängliche Besatzdichte betrug für beide Herkünfte entweder 7,63 kg/ m³ für die intensive Haltung oder 2,0 kg/ m³ für die extensive Haltung. Die Teiche wurden am 01.02.2017 wie folgt bestückt:

- E1: 241 kg Starnberger Forellen, 7,63 kg/ m³, „Starnberg intensiv“ (Sta in)
- E2: 78 kg Starnberger Forellen, 2 kg/ m³, „Starnberg extensiv“ (Sta ex)
- E8: 241 kg Wielenbacher Forellen, 7,63 kg/ m³, „Wielenbach intensiv“ (Wie in)
- E7: 78 kg Wielenbacher Forellen, 2 kg/ m³, „Wielenbach extensiv“ (Wie ex)

Die Starnberger-Forellen hatte eine Anfangsgröße von 20,77 ± 13,7 cm und ein Gewicht von 95,4 ± 18,4 g (Mittelwert ± S. D., n = 50). Die Wielenbacher-Forellen hatte eine Anfangsgröße von 20,17 ± 11,5 cm und ein Gewicht von 84,6 ± 14,5 g. Alle zwei Wochen wurden 100 zufällig ausgewählte Fische aus jedem Teich gefangen und ihr Gewicht ermittelt, um das Durchschnittsgewicht der Fische und die gesamte Fischbiomasse zu berechnen. Die Fische wurden unter einem natürlichen Lichtregime (47° 59' 59.861" N) aufgezogen und mit einem kommerziellen Bio-Trockenfutter, Smaragd Fingerling NL 30 und Smaragdforut NL 45 (Skretting, Norwegen) gefüttert. Die Fütterung wurde täglich zwischen 9:00 und 10:00 Uhr durchgeführt. Die Fütterung begann mit 1,2 % Futtermittel der Fischbiomasse und wurde im Verlauf des Versuchs wie in Tabelle 2 dargestellt angepasst.

Tabelle 2 Berechnung der Fütterungsmenge in Prozent Körpermasse im Praxisversuch. Dargestellt ist die berechnete, angepasste Menge in % Körpermasse (% KG) für die verschiedenen Versuchsansätze nach Wochen. Die Anpassung der Futtermenge erfolge jeweils nach der 2-wöchigen Zwischenwiegung. Sta = Starnberg; Wie = Wielenbach; in = intensiv; ex = extensiv; E bezeichnet die Teiche 1, 2 und 7 und 8. Sta = Starnberg. Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg) erhoben.

Datum	Fütterung (% KG)			
	E1 (Sta in)	E2 (Sta ex)	E7 (Wie in)	E8 (Wie ex)
01.02.-14.02.2017	1,20	1,20	1,20	1,20
15.02.-07.03.2017	1,10	1,10	1,10	1,10
08.03.-14.03.2017	1,00	1,00	1,00	1,10
15.03.-28.03.2017	1,00	1,00	1,00	1,00
29.03.-18.04.2017	0,95	0,95	0,95	0,95
19.04.-25.04.2017	0,925	0,925	0,925	0,925
26.04.-27.04.2017	0,90	0,90	0,90	0,90

Routinemäßige Messungen der Wasserqualität beinhalteten gelösten Sauerstoff (WTW Oxi 3205; Xylem Inc, USA), Wassertemperatur, pH (WTW pH 325) und Leitfähigkeit (WTW Multiline p4).

Während des Versuchs wurde eine Startbeprobung vor Aufteilung der beiden Herkünfte in die zwei unterschiedlichen Besatzdichten und eine Zwischenbeprobung nach 48 Tagen (7 Wochen) und Endbeprobung nach 37 Tagen (12 Wochen).

Jeweils Sechs zufällig ausgewählte Fische aus der ganzen Gruppe wurden gefangen, mechanisch (Kopfschlag) betäubt und Blut, wie in Kapitel 3.1 und 3.3 beschrieben entnommen. Länge und Gewicht der einzelnen Fische wurde bestimmt, das Blut wurde für weitere Untersuchungen in RNAlater konserviert und der Hämatokrit Wert wurde ermittelt (vgl. Kapitel 3.3.1, Seite 29). Alle Beprobungen erfolgen am frühen Nachmittag zwischen 15:00 und 16:00 Uhr. Die spezifische Wachstumsrate (SGR) und das Futterumwandlungsverhältnis (FCR) wurden wie unter Kapitel 3.2, Seite 28 beschrieben berechnet.

Proben wurden bis zur Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Das Töten der Fische erfolgte nach §4 Abs. 3, Satz 1 des geänderten deutschen Tierschutzgesetzes und die Anzahl der verwendeten Tiere wurde nach §1, Abs. 1, Satz 2 des Deutschen Dekrets über die Rückführung von Labortieren vom 12. Dezember 2013 im laufenden Kalenderjahr gemeldet.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 20.0 (IBM SPSS Statistics 20, Armonk, New York). Als Maß für die Streuung wurden das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung vom Mittelwert berechnet. Die Untersuchung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov Smirnov-Test. Mit dem Levene-Test wurde die Varianzhomogenität überprüft. Bei normalverteilten, homogenen Daten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (engl. analysis of variance; ANOVA) durchgeführt und als Post-Hoc-Test der Tukey-Test angewandt. Lag keine Normalverteilung oder eine Varianzheterogenität vor, wurden die Daten mittels dem Kruskal-Wallis-Test und dem Post-Hoc-Test Dunnett-T3 ausgewertet. Zur Beurteilung einer möglichen linearen Korrelation zwischen zwei Variablen wurden der Korrelationskoeffizient nach Pearson, sowie die lineare Regressionsanalyse verwendet. Für alle statistischen Tests wurde $p \leq 0,05$ (zweiseitig) als signifikant angesehen.

4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse sortiert nach Parametern und Versuchen dargestellt. Eine Bewertung der verschiedenen Stressmarker wird in der Diskussion gegeben.

4.1 Vorversuch

4.1.1 Wasserqualität

Im Verlauf des Versuchszeitraumes konnte eine geringfügige Abnahme der Sauerstoffkonzentration in den Versuchsbecken gemessen werden. Dabei sank die Sauerstoffkonzentration von 8,4 mg/ L bei Versuchsstart auf 7,6 mg/ L bei Versuchsende ab. Die Wassertemperatur ($18,47 \pm 0,69$ °C), der pH-Wert ($7,54 \pm 0,09$) und die chemischen Wasserparameter NH_4 ($0,33 \pm 0,15$ mg/ L) und NO_2 ($1,30 \pm 0,70$ mg/ L) waren während des gesamten Versuchszeitraumes konstant und entsprachen den gewählten Versuchsbedingungen. Die Trübung nahm im Verlauf des Versuchs zu.

4.1.2 Gesundheit und Verhalten

Forellen der Fütterungsgruppen SBM66 und SBM100 wiesen zehn Tage nach Versuchsbeginn teils blutigen Durchfall auf, der bis Ende des Versuchszeitraumes anhielt. Ab Tag 14 konnten ebenfalls Durchfälle bei Forellen der Austauschgruppe SBM33 dokumentiert werden. Mortalitäten traten nicht auf. Bei der Probenentnahme fanden sich mit Ausnahme von mittel- bis hochgradig weichem Darminhalt und geringgradigen Rötungen der Darmschleimhaut in den oben benannten Gruppen, makroskopisch keine auffälligen pathologisch-anatomischen Befunde. Nach anfänglichen Rangordnungskämpfen wiesen alle Forellen während des Versuches ein ruhiges Verhalten auf. Lediglich während der Fütterungszeiten konnten hektische Schwimmbewegungen festgestellt werden.

4.1.3 Wachstums- und Performanceleistung

Über den achtwöchigen Versuchszeitraum hinweg, konnte eine geringe aber stetige Gewichtszunahme der Versuchsgruppen nachgewiesen werden, wobei die Versuchsgruppen durchschnittlich zwischen 25 g (SBM100) und 64 g (CD) zunahmten. Ein Austausch von Fischmehl durch Sojabohnenmehl im Futtermittel zeigte beim Vergleich der Endgewichte der Fütterungsgruppen (SBM33, SBM66 und SBM100) und der Kontrollgruppe (CD) keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtszunahme. Dennoch tendierten die ermittelten Endgewichte mit steigender Sojasupplementierung zu vergleichbar niedrigeren Werten. Auch zwischen den spezifischen Wachstumsraten (SWR; $p = 0,55$) und dem Futterquotienten (FQ; $p = 0,53$) waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchsgruppen festzustellen. Da beide Parameter knapp oberhalb des Signifikanzniveaus lagen, wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die steigende Supplementierung von Sojabohnenmehl im Futtermittel negativ mit der spezifischen Wachstumsrate korreliert (Abbildung 3, A; $B = 0,05$, $p = 0,13$). Zudem konnte festgestellt werden, dass der Futterquotient mit steigendem Sojaanteil im Austauschfutter signifikant anstieg (Abbildung 3, B; $B = 0,031$, $p = 0,17$).

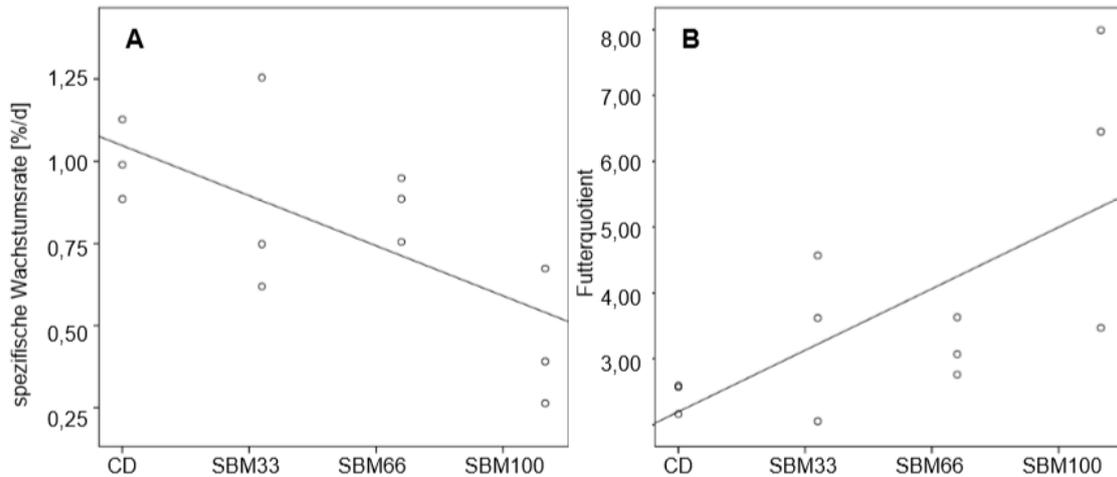


Abbildung 3 Korrelation zwischen der spezifischen Wachstumsrate, dem Futterquotienten und den Versuchsgruppen. Aufgeführt ist die mittels linearer Regressionsanalyse ermittelte Korrelation zwischen A: der spezifischen Wachstumsrate SWR (%/d, $R^2 = 0,479$) und B: dem Futterquotient FQ (dimensionslos, $R^2 = 0,479$) mit den Versuchsgruppen (CD, SBM33, 66 und 100; $n = 51$).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Fische, welche das Futter mit 100 % igem Fischmehlaustausch erhielten, signifikant niedrigere Futteraufnahmen gegenüber der Gruppe CD besaßen ($p = 0,025$). In den übrigen Wachstums- und Performanceparametern (SWR, HSI, SSI) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Soja-Fütterungsgruppen nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte in jeder Fütterungsgruppe ein sehr starkes Auseinanderwachsen der Tiere beobachtet werden. Hierbei differenzierten sich einige Exemplare heraus, welche die anderen Versuchstiere teils um das Doppelte bis Dreifache an Gewicht und Größe übertrafen.

Tabelle 3 Wachstums- und Performanceleistung der untersuchten Regenbogenforellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) für das durchschnittliche Initial- und Endgewicht (g, $n = 51$) eines Fisches, der Fulton'sche Konditionsfaktor (K, dimensionslos, $n = 12$), die tägliche Futteraufnahme (DFI, %/d, $n = 51$), der Futterquotient (FQ, dimensionslos, $n = 51$), die spezifische Wachstumsrate (SWR, %/d, $n = 51$), der Hepatosomatische Index (HSI, dimensionslos, $n = 12$) und der Splenosomatische Index (SSI, dimensionslos, $n = 12$). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Index-Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$).

	CD	SBM33	SBM66	SBM100
Initialgewicht [g]	81,75 ± 0,16	82,09 ± 0,90	81,44 ± 0,85	82,15 ± 0,40
Endgewicht [g]	146,10 ± 10,49	138,26 ± 29,64	134,52 ± 8,66	106,74 ± 13,19
K	0,89 ± 0,24	0,95 ± 0,29	0,94 ± 0,22	0,88 ± 0,20
DFI [%/d]	2,43 ± 0,13 ^a	2,70 ± 0,13 ^{a,b}	2,69 ± 0,07 ^{a,b}	2,32 ± 0,21 ^b
FQ	2,38 ± 0,25	3,41 ± 1,27	3,15 ± 0,44	5,97 ± 2,30
SWR [%/d]	1,00 ± 0,12	0,87 ± 0,34	0,86 ± 0,10	0,44 ± 0,21
HSI	1,37 ± 0,16	1,43 ± 0,29	1,27 ± 0,19	1,21 ± 0,21
SSI	0,19 ± 0,07	0,12 ± 0,06	0,12 ± 0,05	0,14 ± 0,04

4.1.4 Histo-pathologische Untersuchung

Distale Darmabschnitte einiger der untersuchten Fische zeigten leichte bis mittelschwere entzündliche Veränderungen. Unterschiede zeigten sich bei der Schwere der beobachteten morphologischen Veränderungen. Alle Fütterungsgruppen hatten mindestens einen Fisch,

der eine leichte Infiltration der Lamina propria und der Submukosa durch eine Mischpopulation von Leukozyten zeigte. Dennoch korrelierte das Auftreten von Entzündungen mit dem Anteil an Sojabohnenmehl im Futter. Entzündliche Veränderungen fanden sich am meisten in der SBM100 Gruppe, wobei 3 Fische eine moderate Entzündung und 2 Fische leichte Veränderungen aufwiesen. In der SBM66 traten am zweit häufigsten entzündliche Veränderungen mit 5 Fischen, die leichte Veränderungen zeigten, auf.

Der Verlust der supranukleären Vakuolisierung in den Enterozyten zeigte eine insgesamt stärkerer Ausprägung im Vergleich zur Infiltration der Submukosa und der Lamina propria mit Entzündungszellen, folgte jedoch dem gleichen Häufigkeitsmuster und war am deutlichsten bei SBM100, gefolgt von der SBM66 Gruppe, ausgeprägt. Die supranukleäre Vakuolisierung kann mit entzündlichen Veränderungen einhergehen, ist aber kein auf Entzündungen beschränktes morphologisches Merkmal.

Die Unterschiede in den morphologischen Veränderungen zwischen den Fütterungsgruppen waren nach einem Fisher Exact Test nicht statistisch eindeutig, aber Veränderungen in der Submukosa ($p = 0,0865$) und die supranukleäre Vakuolisierung der Enterozyten ($p = 0,0568$) zeigten signifikante Trends zwischen den Fütterungsgruppen (Abbildung 4).

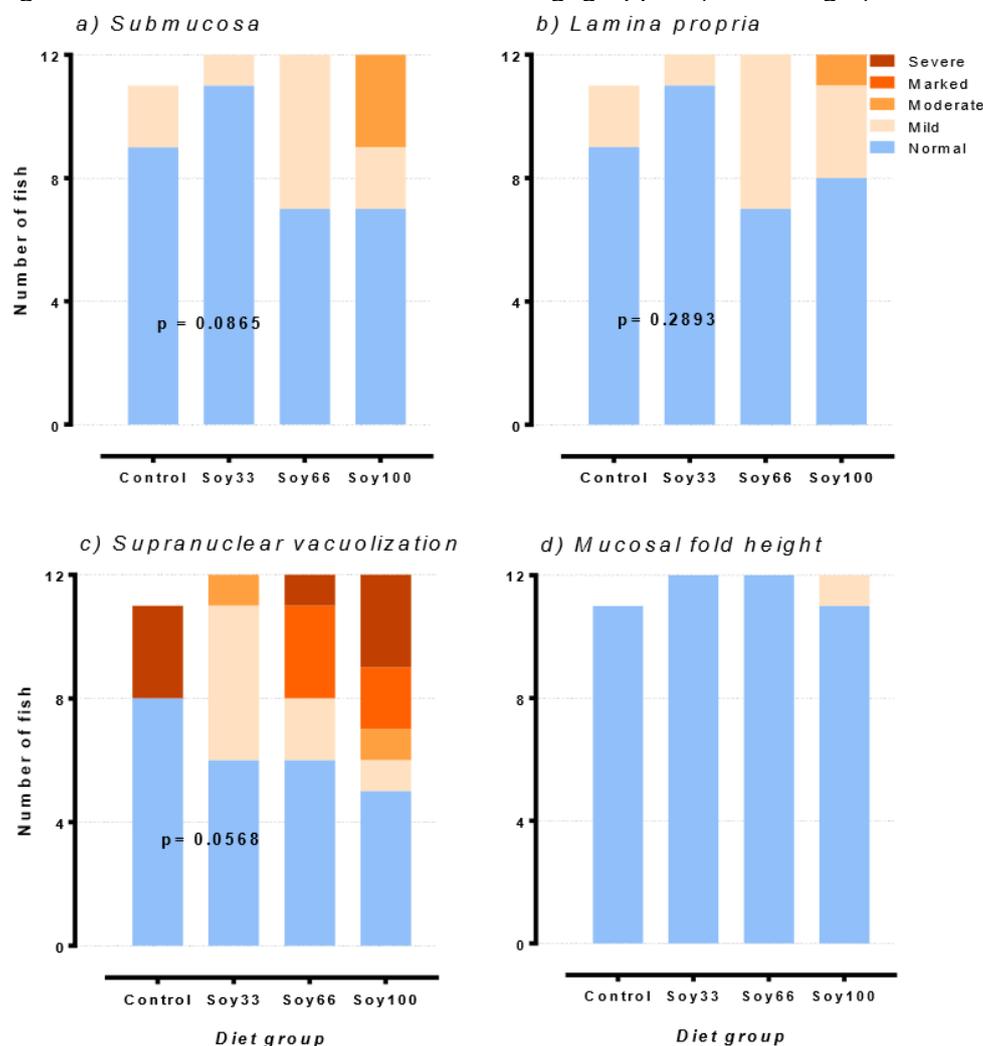


Abbildung 4 Histologische Beurteilung der Darmschnitte aus dem Fütterungsversuch. Die Graphiken zeigen die Anzahl an Darmschnitten ($n = 6$) die mit "normal", "mild", "moderat" und "hochgradig" bewertet wurden. Untersucht wurde auf verschiedene morphologische Charakteristika: (a) Höhe der mukosalen Zotten, (b) Zunahme von Breite und Entzündungszellinfiltration in die Submukosa, (c) Lamina propria (d), und Reduktion der supranukleären Vakuolisierung in Enterozyten. Soy = SBM. Die Daten wurden von Elvis Chikwati, Uni Oslo erhoben.

Die Anzahl an Melanomakrophagen in Leber und Milz war bei SBM100 auffällig erhöht, jedoch nicht signifikant verändert. Die Makrophagencluster waren im Verhältnis größer als bei den anderen Fütterungsgruppen und nahmen zum Versuchsende tendenziell zu.

4.1.5 Blutparameter

4.1.5.1 Hämatokrit

Die im Versuch gemessenen Hämatokritwerte lagen durchschnittlich zwischen 22 % bis 33 % und wiesen innerhalb der Versuchsgruppen erhebliche Schwankungen auf (siehe Tabelle 4). Ein Vergleich zwischen den Hämatokritwerten und dem Körpergewicht der untersuchten Regenbogenforellen, zeigte nach dem Pearson Korrelationstest einen positiven signifikanten Zusammenhang (Vzwi $p = 0,003$; Vend $p = 0,015$). Demzufolge stieg der Hämatokritwert mit zunehmendem Körpergewicht an (Abbildung 5). Über den Versuchszeitraum wiesen die Forellen bei Versuchsbeginn (V0; $n = 3$) mit einem durchschnittlichen Wert von $22,13 \pm 3,36$ % den niedrigsten Hämatokritwert auf. Im Vergleich dazu konnten zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (Vzwi) bei den Gruppen CD, SBM33 und SBM66 tendenziell höhere Hämatokritwerte verzeichnet werden, während die Gruppe SBM100 (Vzwi = $22,67 \pm 9,50$ %) auf dem Niveau des Ausgangswertes verblieb. Bei Versuchsende (Vend) nahm der Hämatokritwert der Versuchstiere im Vergleich zur Zwischenbeprobung (Vzwi) wieder ab. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Sojagruppen konnten nicht festgestellt werden, dennoch tendierten die ermittelten Werte mit steigender Sojasupplementierung zu vergleichbar höheren Werten.

Tabelle 4 Hämatokritwerte der untersuchten Regenbogenforellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Hämatokritwerte (Hkt, %) jeder Fütterungsgruppe (CD, SBM 33, 66 und 100) bei der Zwischenbeprobung (Vzwi; $n = 9$), sowie bei der Endbeprobung (Vend; $n = 9$). Der Ausgangswert vom Hkt lag bei der Initialbeprobung (V0; $n = 3$) bei $22,13 \pm 3,36$ %.

	CD	SBM33	SBM66	SBM100
Hämatokrit V _{zwi} [%]	$30,33 \pm 6,17$	$29,50 \pm 1,53$	$33,22 \pm 7,99$	$22,67 \pm 9,50$
Hämatokrit V _{end} [%]	$23,39 \pm 4,50$	$27,13 \pm 11,40$	$30,40 \pm 6,07$	$32,27 \pm 11,25$

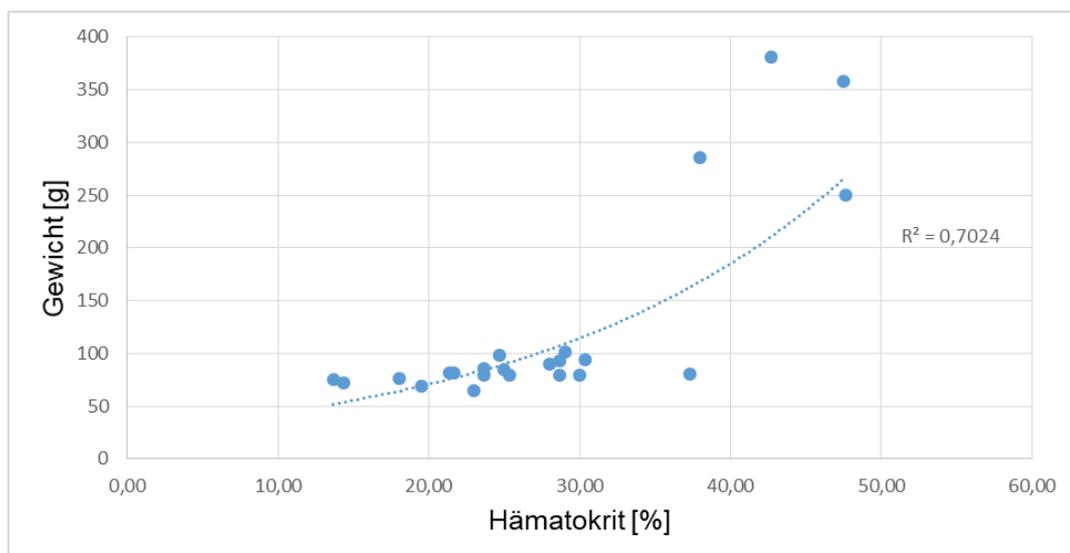


Abbildung 5 Korrelation zwischen dem Gewicht (g) und dem Hämatokrit (%) zum Zeitpunkt der Endbeprobung. $R^2 = 0,7024$. Zu den Zeitpunkten der Initial- und Zwischenbeprobung (hier nicht dargestellt) lag eine deutliche positive Korrelation vor.

4.1.5.2 Differentialblutbild

Mittels lichtmikroskopischer Auswertung der mit Giemsalösung gefärbten Blutausstriche wurde die prozentuale Zusammensetzung der weißen Blutkörperchen und der Thrombozyten von 52 Regenbogenforellen erfasst. Die hierbei ermittelten Daten sind zur besseren Übersicht in Abbildung 6 aufgeführt.

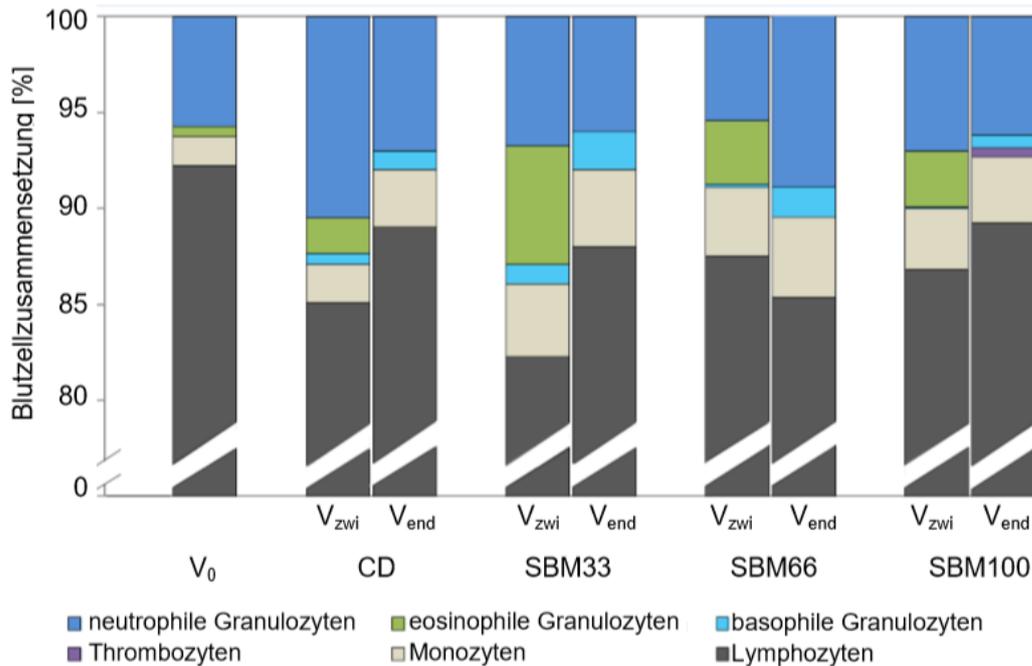


Abbildung 6 Zelluläre Blutzusammensetzung der untersuchten Regenbogenforellen. Aufgeführt ist die prozentuale Verteilung der Leukozyten und Thrombozyten von Forellen der vier Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) bei der Initialbeprobung (V_0 ; $n = 3$) Zwischenbeprobung (V_{zwi} ; $n = 9$), sowie bei der Endbeprobung (V_{end} ; $n = 9$).

Im Vergleich zur zellulären Blutzusammensetzung bei Versuchsstart (V_0) konnte bei den Versuchsgruppen (CD, SBM33, SBM66 und SBM100) zur Zwischenbeprobung (V_{zwi}) ein tendenziell niedriger Gehalt des prozentualen Lymphozytenanteils und eine damit verbundene Steigerung der prozentualen Granulozyten- und Monozytenanteile ermittelt werden. Bei der Endbeprobung (V_{end}) war der Anteil an prozentualen Lymphozyten in den Gruppen CD, SBM33 und SBM100, verglichen mit der Zwischenbeprobung, tendenziell höher. Mit Ausnahme von Forellen der Gruppe SBM66, bei der im Mittel die niedrigsten prozentualen Lymphozytenanteile bei Versuchsende (V_{end}) gemessen wurden. Dabei korrelierte der Anstieg der Lymphozyten mit einem Rückgang der neutrophilen Granulozyten. Die prozentualen Monozyten- und basophilen Granulozytenanteile wiesen dagegen im Vergleich zur Zwischenbeprobung keine deutlichen Veränderungen auf. Des Weiteren konnten bei der Endbeprobung keine eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Das Vorkommen der Thrombozyten konnte im gesamten Untersuchungsverlauf nur bei Individuen der Fütterungsgruppe SBM100 mit einem prozentualen Anteil von 1 % am Versuchsende dokumentiert werden. Ein Austausch von Fischmehl durch Sojamehl im Futtermittel hatte keinen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Blutzusammensetzung der Regenbogenforellen. Auch innerhalb der Fütterungsgruppen konnten über den Zeitraum keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

4.1.5.3 Cortisol

Die immunbiologische Analyse zeigte zwischen den Fütterungsgruppen (SBM33, SBM66, SBM100) und der Kontrollgruppe (CD) keine signifikanten Unterschiede. Dennoch war ein Trend zu erkennen, der auf eine steigende Cortisolkonzentration in Verbindung mit einem steigenden Sojaanteil im Futtermittel hindeutete (Tabelle 5 und Abbildung 7). Weiterhin konnten starke individuelle Schwankungen der Cortisolkonzentration innerhalb der

Fütterungsgruppen festgestellt werden, die sich durch eine große Standardabweichung widerspiegelten.

Tabelle 5 Cortisolgehalte im Serum der untersuchten Regenbogenforellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der Cortisolkonzentration (ng/mL) von jeder Fütterungsgruppe (CD, SBM 33, 66 und 100) bei der Zwischenbeprobung (V_{zwi} ; $n = 6$), sowie bei der Endbeprobung (V_{end} ; $n = 6$). Der Ausgangswert der Cortisolkonzentration lag bei der Initialbeprobung (V_0 ; $n = 3$) bei $2,6 \pm 0,53$ ng/mL.

	CD	SBM33	SBM66	SBM100
Cortisolgehalt V_{zwi} [ng/mL]	4,93 ± 2,82	5,89 ± 5,11	9,88 ± 12,76	13,05 ± 21,94
Cortisolgehalt V_{end} [ng/mL]	3,42 ± 3,90	1,92 ± 1,74	3,18 ± 1,61	6,37 ± 8,00

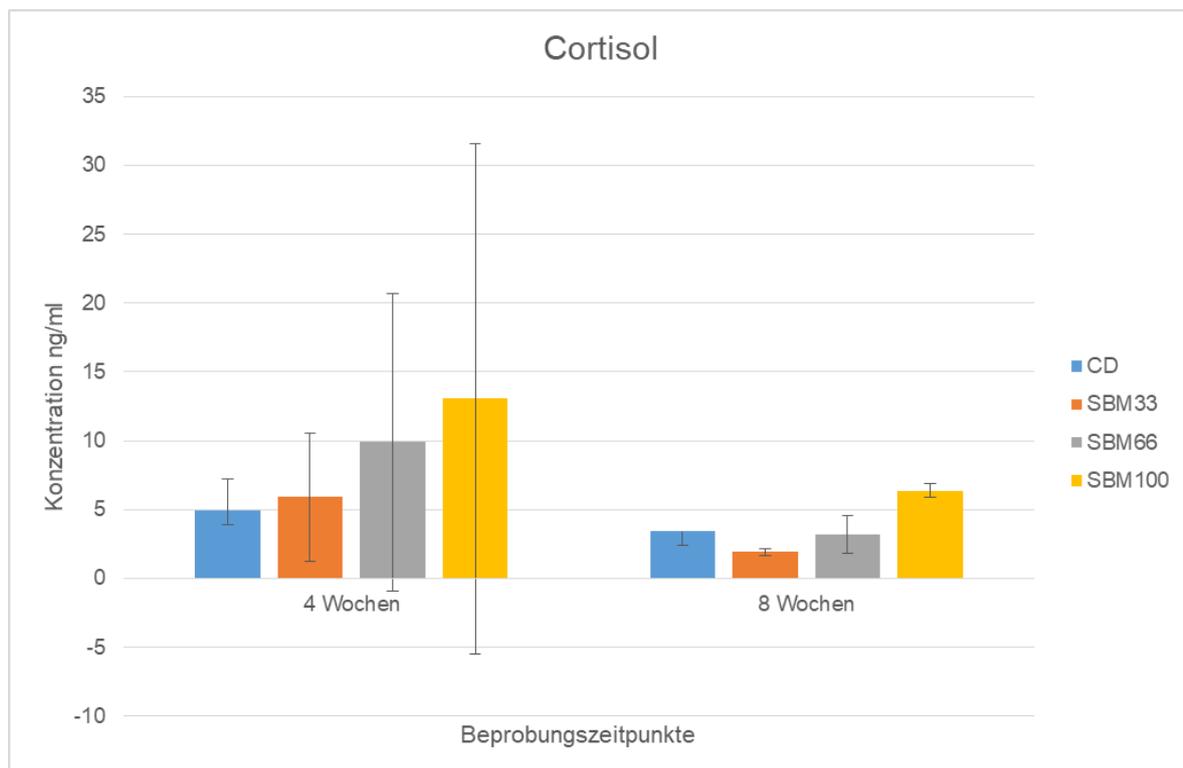


Abbildung 7 Cortisolgehalte im Serum der untersuchten Regenbogenforellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der Cortisolkonzentration (ng/mL) von jeder Fütterungsgruppe (CD, SBM 33, 66 und 100) bei der Zwischenbeprobung (4 Wochen, V_{zwi} ; $n = 6$), sowie bei der Endbeprobung (8 Wochen, V_{end} ; $n = 6$). Der Ausgangswert der Cortisolkonzentration lag bei der Initialbeprobung (V_0 ; $n = 3$) bei $2,6 \pm 0,53$ ng/mL.

Im Untersuchungsverlauf wiesen die Forellen bei Versuchsbeginn (V_0 ; $n = 4$) mit einer durchschnittlichen Konzentration von $2,6 \pm 0,53$ ng/mL den niedrigsten Cortisolwert auf. Im Vergleich dazu konnten nach vierwöchiger Versuchsperiode doppelte bis fünffach höhere Cortisolwerte bei den untersuchten Versuchstieren nachgewiesen werden. Bei Versuchsende nahm der Cortisolwert der Versuchsgruppen CD, SBM66 und SBM100 im Vergleich zur Zwischenbeprobung wieder ab, erreichte aber nicht den Wert der Initialbeprobung. Lediglich die Gruppe SBM33 lag mit einem durchschnittlichen Cortisolgehalt von $1,92 \pm 1,74$ ng/mL unterhalb des Initialwertes. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Blutentnahmezeitpunkten konnten nicht festgestellt werden. Ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Cortisolgehalt und der Dauer der Probennahme, sowie dem Individualgewicht des Fisches wurde mittels eines Pearson Korrelationstest nicht nachgewiesen.

4.1.5.4 Molekularbiologische Untersuchungen im Rahmen des Vorversuchs

Beim Vorversuch/ Fütterungsversuch wurden viele Gene, die der großen Gruppe der Entzündungsreaktionen zugeordnet werden können, hochreguliert. Auch hier lagen teilweise große individuelle Unterschiede vor. Dennoch ergaben sich bei einzelnen Genen signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen SBM33 und SBM100.

In Tabelle 6 sind alle untersuchten Gene aufgelistet. Die grün hinterlegten Gene zeigten im Fluidigm deutliche Unterschiede zwischen den Fütterung-/Stressgruppen und kommen wahrscheinlich als Kandidaten zum Nachweis von Fütterungsstress in Frage. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Alle markierten, jedoch weiß hinterlegten Gene waren zwar nachweisbar, gruppenspezifische Unterschiede waren hier nicht festzustellen. Bei den mit einem Stern markierten Genen fanden sich signifikante Unterschiede in der mRNA Expression zwischen den Gruppen oder innerhalb einer Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten. Die mRNA Expression einzelner Gene wurde mittels eines Light Cycler qPCR Systems quantitativ nachgemessen. Diese sind mit einem Stern gekennzeichnet, wenn sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben. Es ist deutlich zu sehen, dass bezüglich der Signifikanzen eine vollständige Übereinstimmung zwischen Fluidigm- und Light Cycler-Daten besteht.

Tabelle 6 Im Fütterungsversuch getestete Gene. Dargestellt sind die getesteten Gene mit Abkürzung. Den ausführlichem Namen und eine kurzer Beschreibung ihrer Funktion und/oder Wirkung finden sich in Kapitel 2.6, Seite 21. Die mRNA Expression wurde mittels Fluidigm oder light Cycler qPCR System quantitativ bestimmt; * = es lagen signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede vor; X (grün): Unterschiede in der mRNA Expression zwischen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) oder zu unterschiedlichen Beprobungszeitpunkten waren sichtbar; X: mRNA war nachweisbar aber es lagen keine Unterschiede zwischen Fütterungsgruppen vor.

	Fluidigm	Light Cycler
EEF1A	X	X
ACTB	X	X
RPS5	X	X
SERPING 1	X	
SERPING B1	X	
SERPING B2	X	
INPP5D	X	
NODa	X	
NODb	X	
NLRC3	X	
NLRC5	X	
TLR20	X*	X*
TLR22α	X	
TLR3	X*	X*
TLR5	X	
TLR9	X	
RIPK2	X	
IKBA1	X*	
IKBA2	X	
IKBA3	X*	

USP4	X*	
A20	X	
MAP3K5	X	
MAP3K14	X	
MAP3K1	X*	
STAT1	X*	
IL1 β	X	X
IL4/13	X	X
IL6	X	
IL8	X	
IL8-G	Nicht nachweisbar	
IL10-1	Nicht nachweisbar	
IL10-2	X	
IL12	Nicht nachweisbar	
IL22	Nicht nachweisbar	
TNF α 2	X	
TNF β	X	
TGF β 1	X	
TGF β 2	X	
SOCS1	X	
IFN γ 2	Nicht nachweisbar	
CCL4	X	
CXCL8	X	
CXCL12	Nicht nachweisbar	
CXCL14	Nicht nachweisbar	
Forellensp. CC-Protein	X	
HP	X	
SAA	X*	X*
HSP30	X	X
HSP47 α		
HSP47 β	X	
HSP90 AA1 α	X	X
HSP90 AA1 β	X	X
C1q	X	
C1r/s	Nicht nachweisbar	
C3-1	Nicht nachweisbar	
C3-4	Nicht nachweisbar	
C7-1	Nicht nachweisbar	
C7-2	Nicht nachweisbar	
CD59	X	
FGL2	X	
C3 α R	X	
C5 α R	X	
CFI	Nicht nachweisbar	
CFD	X	
PRF	X	

CFH	Nicht nachweisbar	
CD41	X	
A2M	X	
GPR84	X	
LYG1	X*	
LYG2	X*	
LYG3	X	
SOD1	X	
SOD2	X	
MPO	X*	X*
MX1	X	X
NCCRP1	X*	X*
NOS2	X*	X*
PPARG	X	
PSMB7	X	X
UCP2	X*	X*
UCP4	X	
TCBP 1-1	Nicht nachweisbar	
TCBP 2	X	
TCRB	X	
IgM	X	
ENPP3	X*	X*
FTH	X	
G-CSFR	X	
M-CSFR	Nicht nachweisbar	

Es werden nur einzelne Ergebnisse von Genen graphisch dargestellt, bei denen signifikante Unterschiede in der mRNA Expression zwischen den Gruppen oder innerhalb einer Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten vorlagen. Die Daten beziehen sich zum Teil auf die mittels Fluidigm erhobenen Expressionsverhältnisse und wo vorhanden auf die mittels Light Cycler quantitativ bestimmten Kopienzahlen pro μg RNA. Bei der Initialbeprobung wurden nur 3 Fische untersucht. Auf Grund der geringen Stichprobe wurde statistisch nur auf Unterschiede zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung nach 4 Wochen und zum Zeitpunkt der Endbeprobung nach 8 Wochen getestet.

In allen getesteten Haushaltsgenen (EEF1A, RPS5, ACTB) zeigte die mRNA Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen, Beprobungszeitpunkten oder Besatzdichten. Sie wurden mit gNorm stabil getestet. Damit konnten sie zur Normalisierung verwendet werden.

Die mRNA Expression des Entzündungszellmarkers **Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS2)** ist, wie einige andere untersuchten Gene zum Startzeitpunkt sehr hochreguliert und wird zur Zwischenbeprobung von allen Fütterungsgruppen nur noch sehr gering exprimiert. Nach 8 Wochen zeigt sich wieder eine vermehrte Expression mit steigender Menge an Sojabohnenmehl im Futter bei der SBM66- und SBM100-Gruppe und es liegt ein signifikanter Unterschied in der mRNA Expression zwischen SBM33 und SBM100 vor ($p = 0,0312$; Abbildung 8).

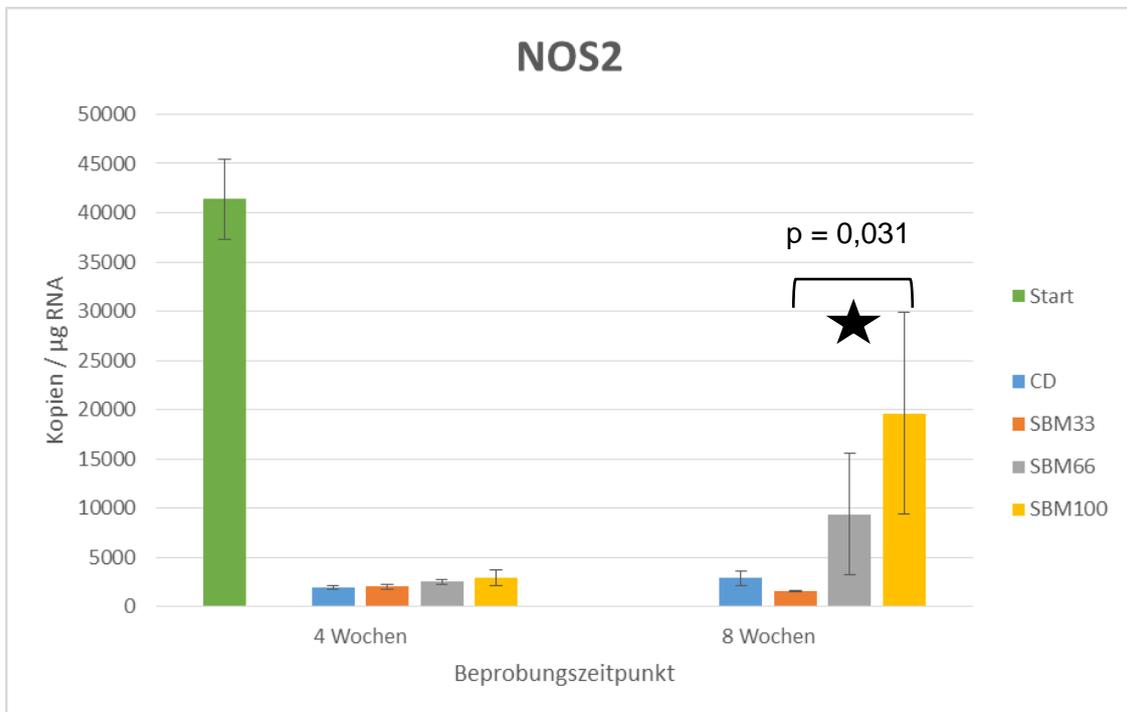


Abbildung 8 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μg RNA der Stickstoffmonoxid-Synthase. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Die Startbeprobung wurde auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen.

Die mRNA Expression des Entzündungszellmarkers **Mitochondrial uncoupling Protein** (UCP), hier Primervariante 2, wird im Vergleich in sehr geringen Kopienzahlen exprimiert (nach 4 Wochen < 50 Kopien/ μg RNA bei allen Gruppen). Auffällig waren auch hier die erhöhte Expression zum Startzeitpunkt und der Anstieg der mRNA Expression bei SBM66 und SBM100 nach 8 Wochen. Es findet sich ein signifikanter Anstieg zwischen der mRNA Expression von UCP bei SBM100 nach 4 und 8 Wochen ($p = 0,0163$), sowie nach 8 Wochen ein signifikanter Unterschied zwischen SBM33 und SBM100 ($p = 0,0138$; Abbildung 9).

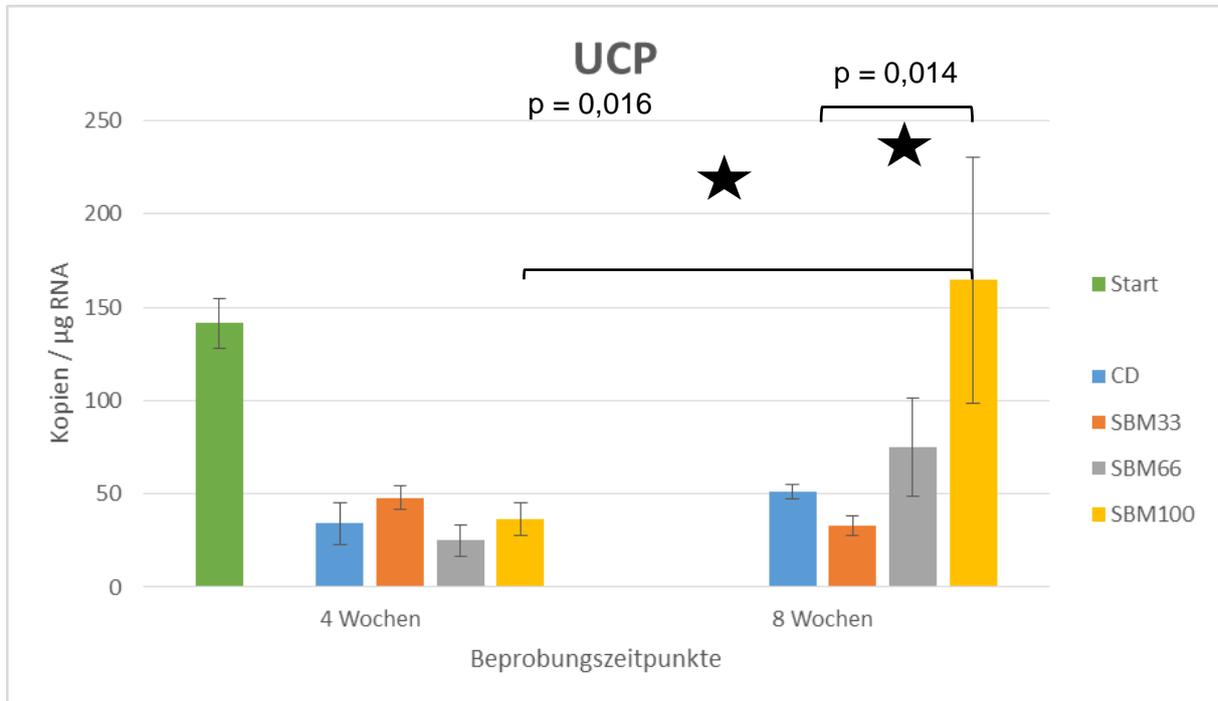


Abbildung 9 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μg RNA des Mitochondrial uncoupling Protein. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Die Startbeprobung wurde auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen.

Insgesamt wurde die **Ubiquitin spezifischen Protease 4 (USP)** in ähnlich hohen Kopienzahlen wie TLR20 exprimiert. Es fanden sich signifikante Unterschiede zwischen der SBM66- und der SBM100-Gruppe nach 4 Wochen ($p = 0,015$). Die mRNA Expression war nach 4 Wochen in der SBM100 im Vergleich zum Startzeitpunkt deutlich herunterreguliert. Da für CD nach 8 Wochen nur ein Datenpunkt zur Verfügung stand wird der Abfall der mRNA Expression in der Kontrollgruppe nicht bewertet, zumal die Kopienzahlen den SBM33- und SBM66-Gruppen nahezu unverändert blieben (Abbildung 10).

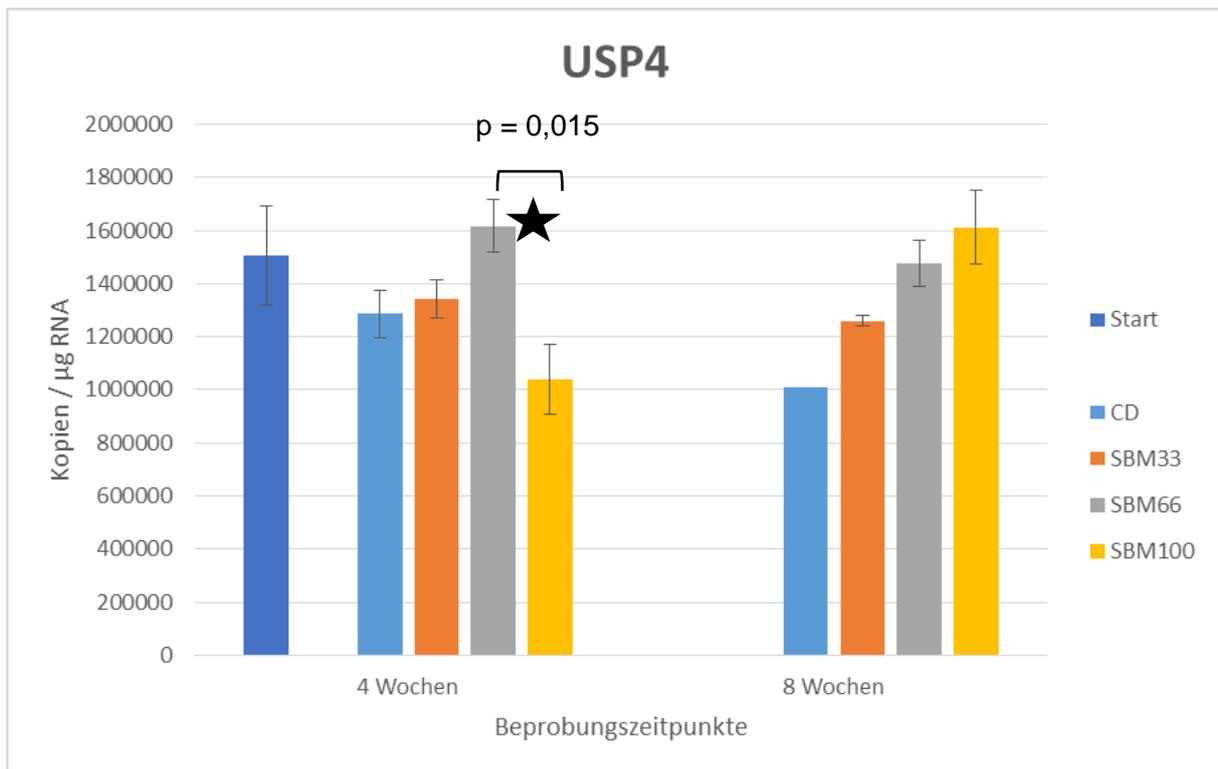


Abbildung 10 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / µg RNA der Ubiquitin spezifischen Protease 4. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$; CD: $n = 1!$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Index-Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$). Die Startbeprobung und die CD, 8 Wochen wurden auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen.

Die mRNA Expression der **MAP-3-Kinase** (MAP3K1), Teil des MAP-Kinase Signalweges, war signifikant in der SBM100 herunterreguliert, sowohl nach 4 als auch nach 8 Wochen herunterreguliert. Nach 4 Wochen fanden sich signifikante Unterschiede sowohl zwischen CD und SBM100 ($p = 0,000$), zwischen SBM33 und SBM100 ($p = 0,001$) und SBM66 und SBM100 ($p = 0,000$). Nach 8 Wochen lag immer noch ein signifikanter Unterschied zwischen der SBM33- und SBM100-Gruppe ($p = 0,04$) vor. Der Unterschied zwischen der SBM66 und SBM100 Gruppe zeigte mit $p = 0,070$ eine signifikante Tendenz (Abbildung 11).

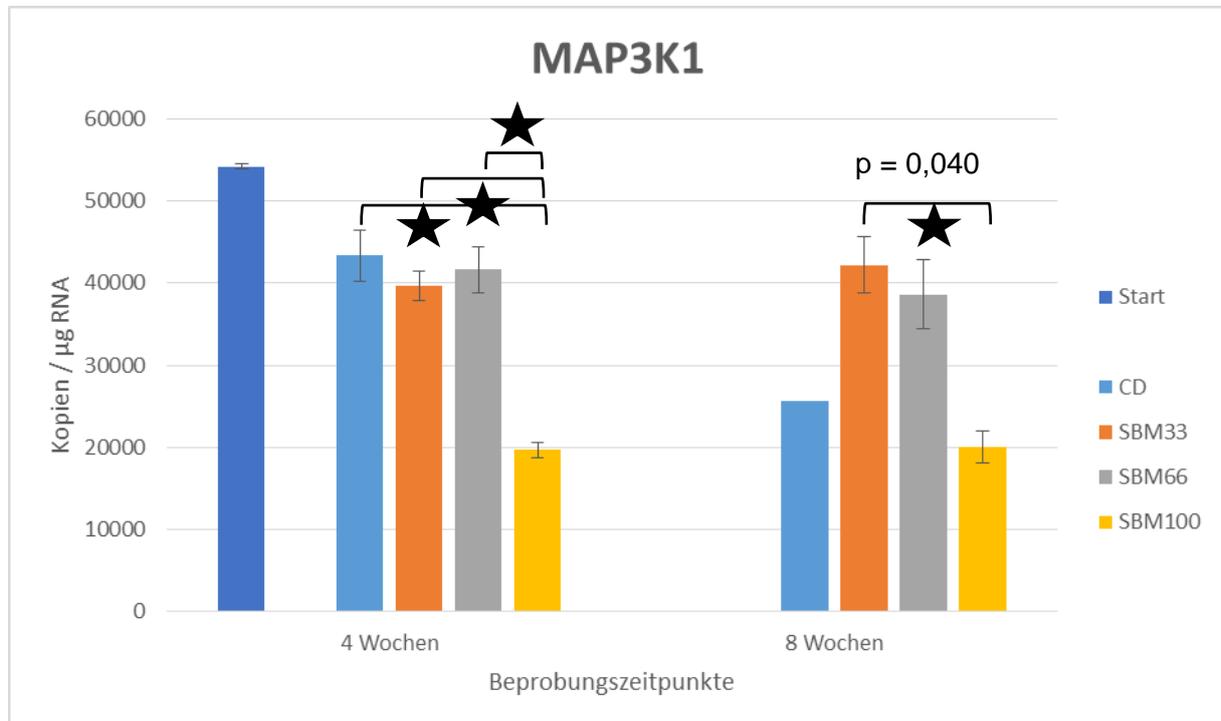


Abbildung 11 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / µg RNA der MAP-3-Kinase. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$; CD: $n = 1!$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Index-Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$). Die Startbeprobung und die CD, 8 Wochen wurden auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen.

Die mRNA Expression des Transkriptionsfaktors **STAT1**, Teil des JAK/STAT Signalweges wies einen signifikanten Unterschied in der SBM100-Gruppe zwischen dem Beprobungszeitpunkt nach 4 Wochen und nach 8 Wochen auf ($p = 0,013$). Sie war bei SBM100 nach 4 Wochen signifikant herunterreguliert (im Vergleich zu CD, $p = 0,032$; im Vergleich zu SBM33, $p = 0,068$; im Vergleich zu SBM66, $p = 0,010$). Bei den Gruppen CD, SBM33 und 66, welche nach 4 Wochen sogar noch eine etwas höhere Kopienzahl/ μg RNA wie bei der Startbeprobung aufwiesen, fand sich nach 8 Wochen eine Tendenz zur Reduktion der mRNA Expression, während die mRNA Expression bei SBM100 nach 8 Wochen wieder angestiegen war (Abbildung 12).

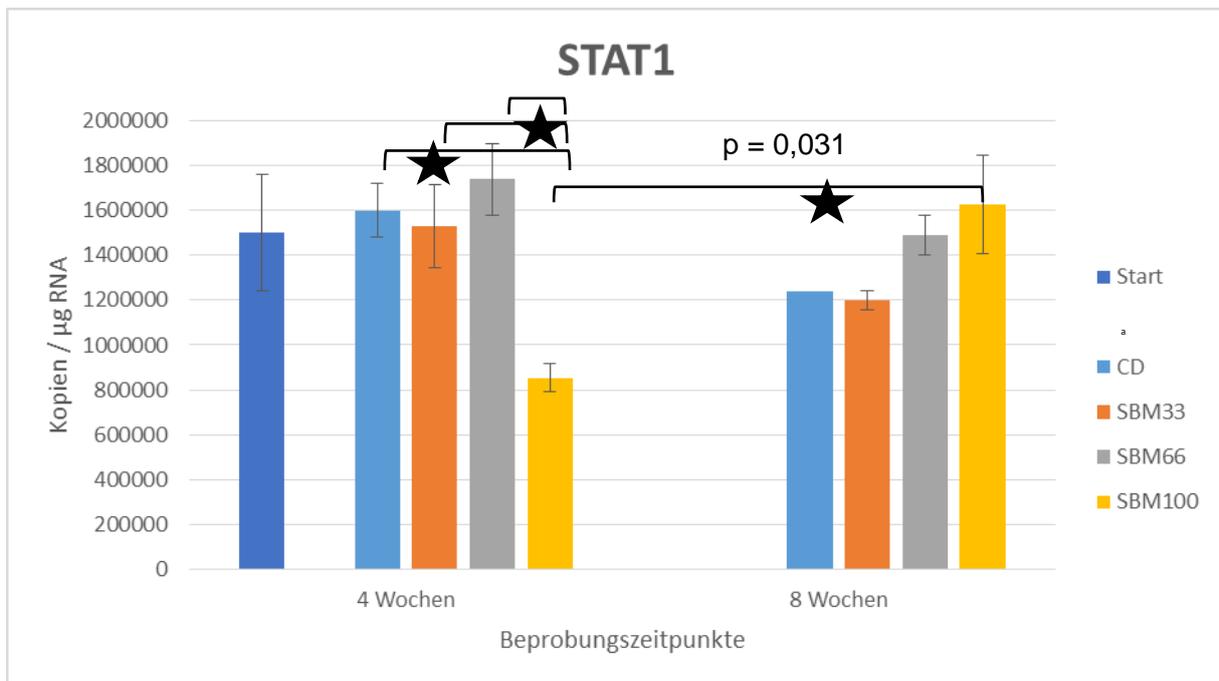


Abbildung 12 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μg RNA von STAT1. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$; CD: $n = 1!$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Index-Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$). Die Startbeprobung und die CD, 8 Wochen wurden auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen.

Die mRNA Expression von **Serum Amyloid A (SAA)**, Bestandteil der Akuten Phase Reaktion, war initial vergleichsweise hoch. Alle Gruppen wiesen jedoch nach 4 Wochen nur noch wenige Kopienzahlen / μg RNA auf, die nach 8 Wochen wieder anstiegen und dann zwischen SBM33 und SBM100 fast signifikant war ($p = 0,0791$). Der Faktor Zeit wurde hier als signifikant getestet ($p = 0,0042$; Abbildung 13).

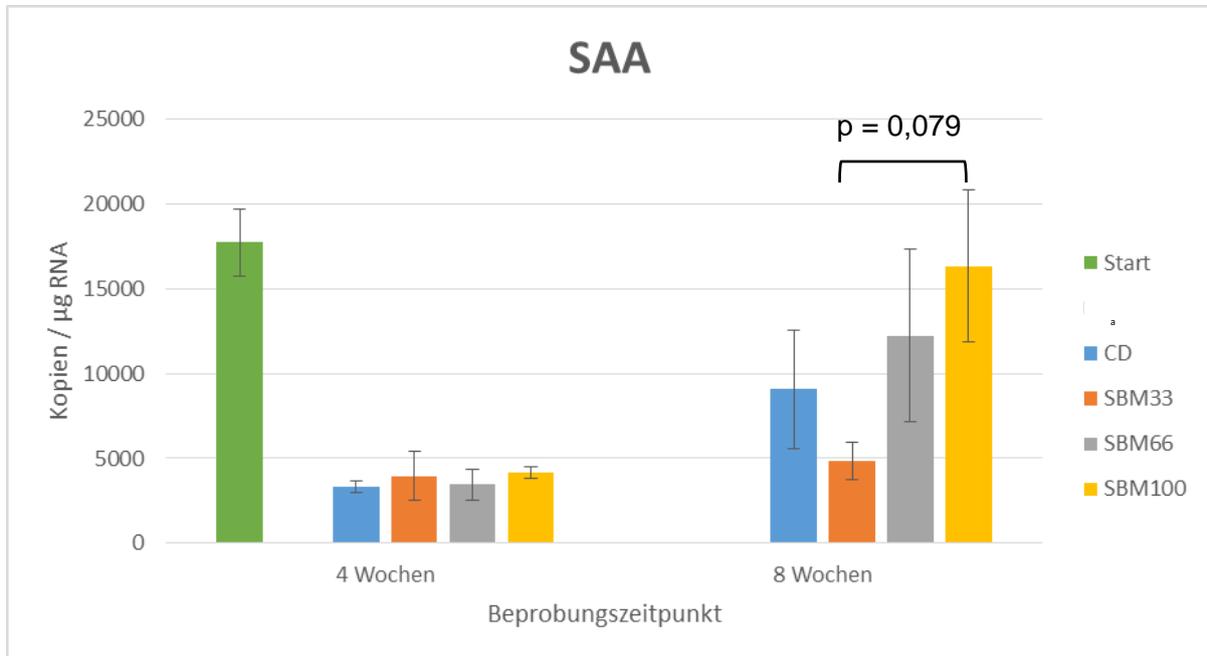


Abbildung 13 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μg RNA des Serum Amyloids A. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Die Startbeprobung wurde auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen.

Die mRNA Expression der Isoform1 des Granulozytenmarkers **g-Typ Lyozym** (LYG1) wies nach 8 Wochen einen nahezu signifikanten Unterschied zwischen der SBM33 und SBM100 Gruppe ($p = 0,073$). Während alle, bis auf SBM66, nach 4 Wochen im Vergleich zur Startbeprobung herunterreguliert wurden, wurde die mRNA Expression von LYG1 in der SBM100-Gruppe bis zum Versuchsende weiter herunterreguliert. Ebenfalls eine fallende Tendenz fand sich bei SBM66, während die mRNA Expression bei SBM33 tendenziell zwischen dem Beprobungszeitpunkt nach 4 Wochen und 8 Wochen anstieg (Abbildung 14).

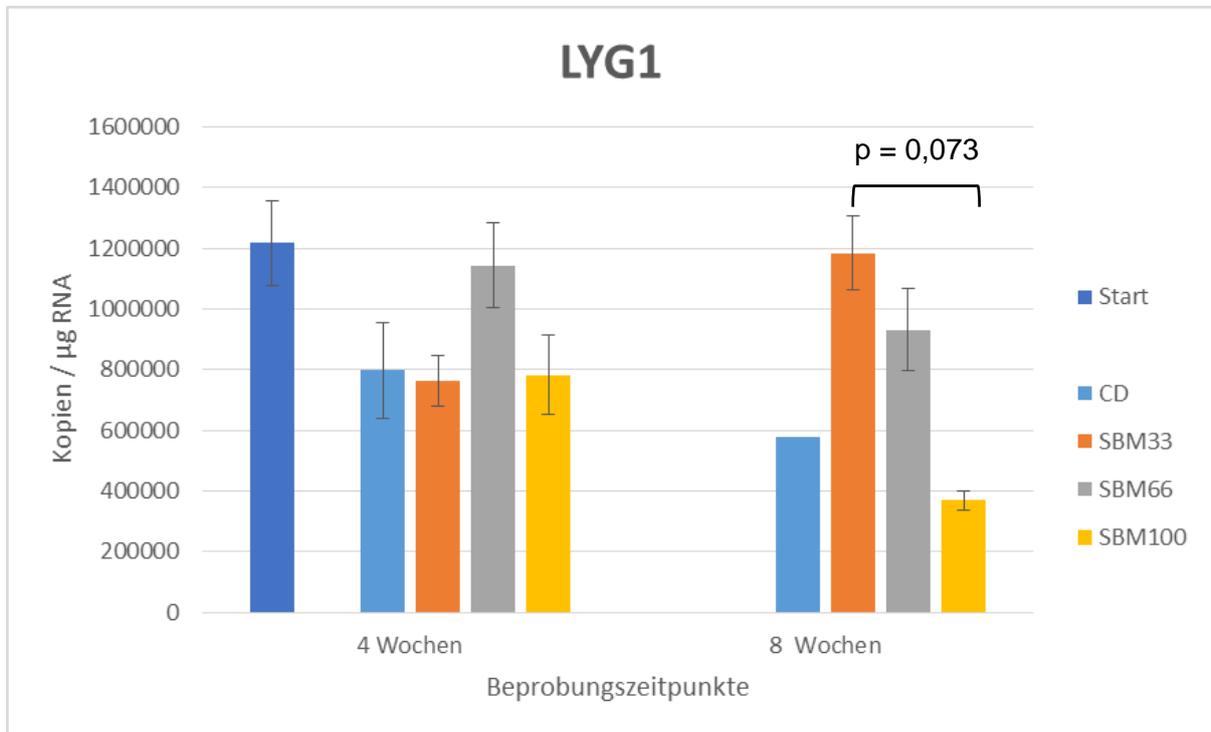


Abbildung 14 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / µg RNA des g-Typ Lyozym 1. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$; CD: $n = 1!$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Index-Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$). Die Startbeprobung und die CD, 8 Wochen wurden auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen.

Die mRNA Expression der Isoform 2 des Granulozytenmarkers **g-Typ Lyozym** (LYG2) verhielt sich etwas anders als LYG1. Insgesamt wurde LYG2 in sehr viel höheren Kopienzahlen/ μg RNA exprimiert und wies nach 4 Wochen einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der SBM33-Gruppe auf ($p = 0,040$). Die mRNA Expression von LYG2 in der SBM66- und SBM100-Gruppe blieb über den gesamten Verlustzeitraum nahezu gleich, wobei die Kopienzahlen bei SBM100 fast doppelt so hoch wie bei SBM66 lagen (Abbildung 15).

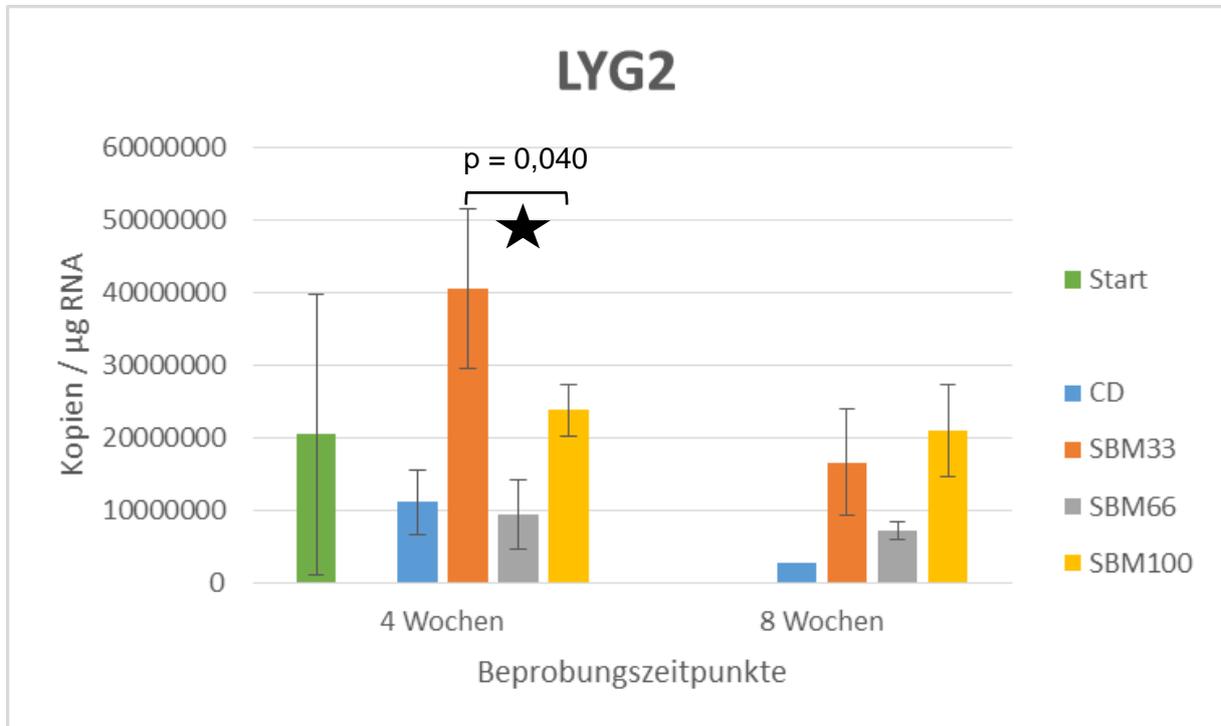


Abbildung 15 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μg RNA des g-Typ Lyozym 2. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$; CD: $n = 1!$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Index-Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$). Die Startbeprobung und die CD, 8 Wochen wurden auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen.

Die mRNA Expression der **Myeloperoxidase (MPO)**, welche an Entzündungsprozessen beteiligt ist wird zwar insgesamt im Vergleich zu vielen anderen Genen sehr gering exprimiert (maximal 1000 Kopien/ μg RNA), weist jedoch eine hohe Expression zu Beginn des Versuchs auf. Nach 4 Wochen ist diese jedoch bei allen Gruppen deutlich abgefallen und fiel bei CD, SBM33 und SBM66 zum Ende des Versuchs noch weiter ab. Bei der SBM100-Gruppe zeigte sich nach 8 Wochen wieder ein Anstieg, der dann auch im Verhältnis zur mRNA Expression von MPO der SBM33-Gruppen signifikant war ($p = 0,0294$; Abbildung 16)

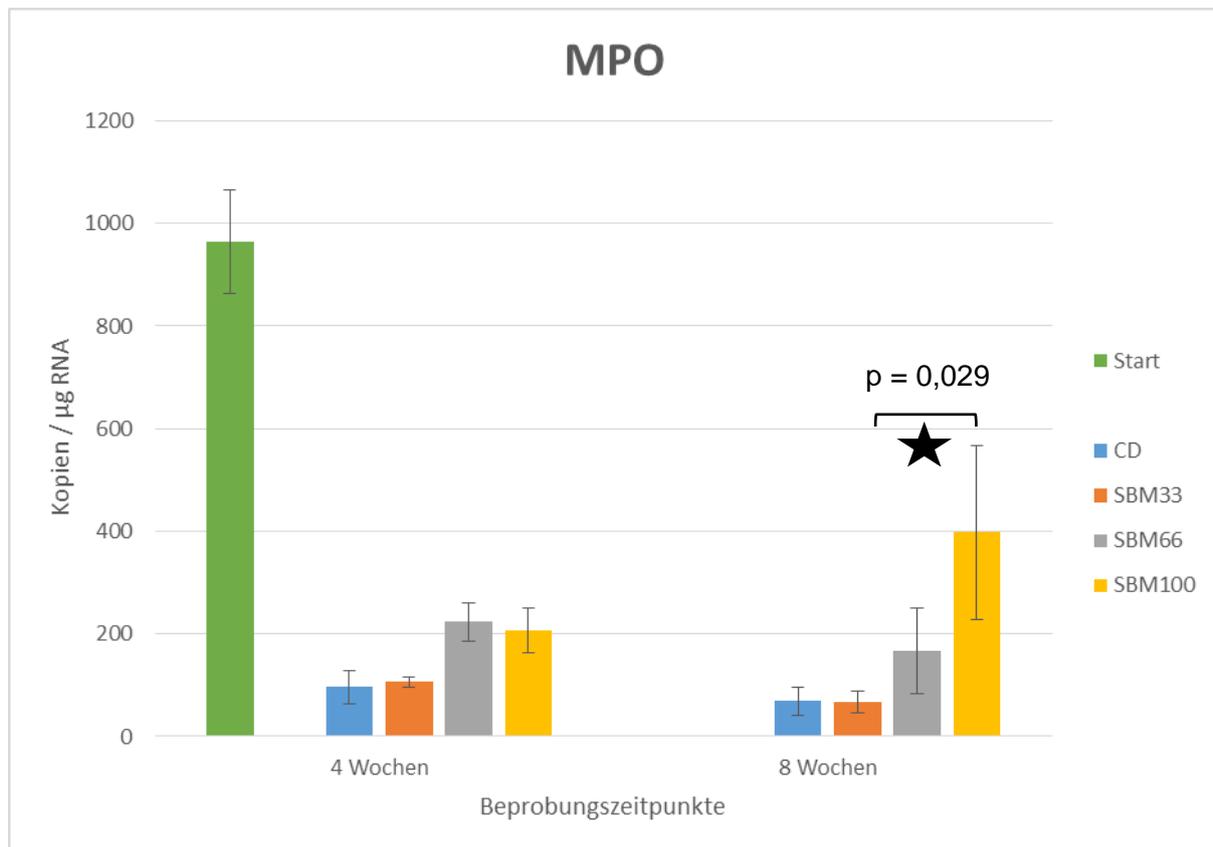


Abbildung 16 Darstellung der normalisierten mRNA Expression in Kopien / μg RNA der Myeloperoxidase. Die Darstellung erfolgt für die unterschiedlichen Fütterungsgruppen (CD, SBM 33, 66 und 100) zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung (nach 4 Wochen, $n = 6$) und zur Endbeprobung (nach 8 Wochen, $n = 6$), sowie Initial, vor Versuchsstart ($n = 3$). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Die Startbeprobung wurde auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht in die Testung auf Signifikanz mit einbezogen.

Die mRNA von einzelnen Genen wurde in einem zweiten Versuchsdurchgang gemessen. Da nicht in jedem Fall ausreichend Probenmaterial mehr vorhanden war, ergeben sich die Unterschiede in der Stichprobengröße und insbesondere in den Daten für CD nach 8 Wochen Versuchslaufzeit.

4.2 Praxisversuch

4.2.1 Wasserqualität

Die gemessenen Wasserwerte (Tabelle 7) entsprachen im Mittel den von der Öko-VO vorgegebenen Mindestwerten. Während die Temperatur mit durchschnittlich $9,46 \pm 0,50$ °C in allen Teichen praktisch gleich war, fanden sich deutliche Unterschiede in der Versorgung mit Sauerstoff. Teich E1, der Starnberger-Forellen in intensiver Besatzdichte beherbergte, wies durchschnittlich nur $69,59 \pm 8,91$ % Sauerstoff auf. Der beste durchschnittliche Sauerstoffgehalt mit $87,05 \pm 10,83$ % wurde in Becken E2 mit extensiv gehaltenen Starnberger-Forellen erzielt. Wobei hier eine hohe Standardabweichung auf mögliche Einbrüche in der Sauerstoffversorgung schließen lassen könnte. Die Standardabweichung ist mit durchschnittlich $10,14$ % insgesamt relativ hoch. Der pH Wert und die Leitfähigkeit befinden sich für offene Teichsysteme im normalen Bereich.

Tabelle 7 Wasserparameter des Praxisversuchs mit zwei verschiedenen Forellenherkünften und Besatzdichten. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der Haltungsgruppen für Temperatur (°C, $n = 80$), des Sauerstoffgehaltes (mg/ L und %, $n = 80$), des pH Wertes (dimensionslos, $n = 80$) und der Leitfähigkeit (μS , $n = 80$). Sta = Starnberg; Wie = Wielenbach; in = intensiv; ex = extensiv; E bezeichnet die Teiche 1, 2 und 7 und 8. Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg) erhoben.

	E1 (Sta in)	E2 (Sta ex)	E7 (Wie in)	E8 (Wie ex)
Temperatur (°C)	$9,44 \pm 0,50$	$9,31 \pm 0,54$	$9,52 \pm 0,48$	$9,58 \pm 0,46$
Sauerstoff (mg/l)	$7,39 \pm 0,88$	$9,31 \pm 1,10$	$8,98 \pm 0,83$	$7,76 \pm 1,27$
Sauerstoff (%)	$69,59 \pm 8,91$	$87,05 \pm 10,83$	$84,72 \pm 8,31$	$73,47 \pm 12,51$
pH	$7,59 \pm 0,14$	$7,64 \pm 0,16$	$7,51 \pm 0,20$	$7,59 \pm 0,30$
Leitfähigkeit (μS)	$802 \pm 19,31$	$793 \pm 7,55$	$790 \pm 6,02$	$789 \pm 5,38$

4.2.2 Gesundheit und Verhalten

Über den gesamten Verlustverlauf von 12 Wochen wurden unterschiedlich hohe Mengen an toten Fischen aus den Becken entfernt. Bei „Sta in“ verstarben insgesamt 1 (212 g; Mittelwert \pm S. D.), bei „Sta ex“ keiner, bei „Wie in“ 5 ($121,5 \pm 42,87$ g) und bei „Wie ex“ 181 ($90,72 \pm 16,25$ g) Forellen (Abbildung 17). Auch auf Grund der Ergebnisse der molekularbiologischen Marker ist eine virale Infektion in Betracht zu ziehen (siehe Kapitel 4.2.4.2, Seite 58). Zum Verhalten liegen keine Angaben vor. Zu den Beprobungszeitpunkten wurden keine makroskopischen Auffälligkeiten an den Organen festgestellt. Die Todesfälle begannen am 12.02.2017 (12 Tage nach Start) in der 2. Versuchswoche, fanden ihren Höhepunkte mit 21 Fischen am 21.02.2017 (4. Versuchswoche) und ebten zum 05.03.2017 (5. Versuchswoche) wieder ab (Abbildung 18). Das mittlere Gewicht der verstorbenen Forellen betrug in diesem Zeitraum $86,84 \pm 7,40$ g.

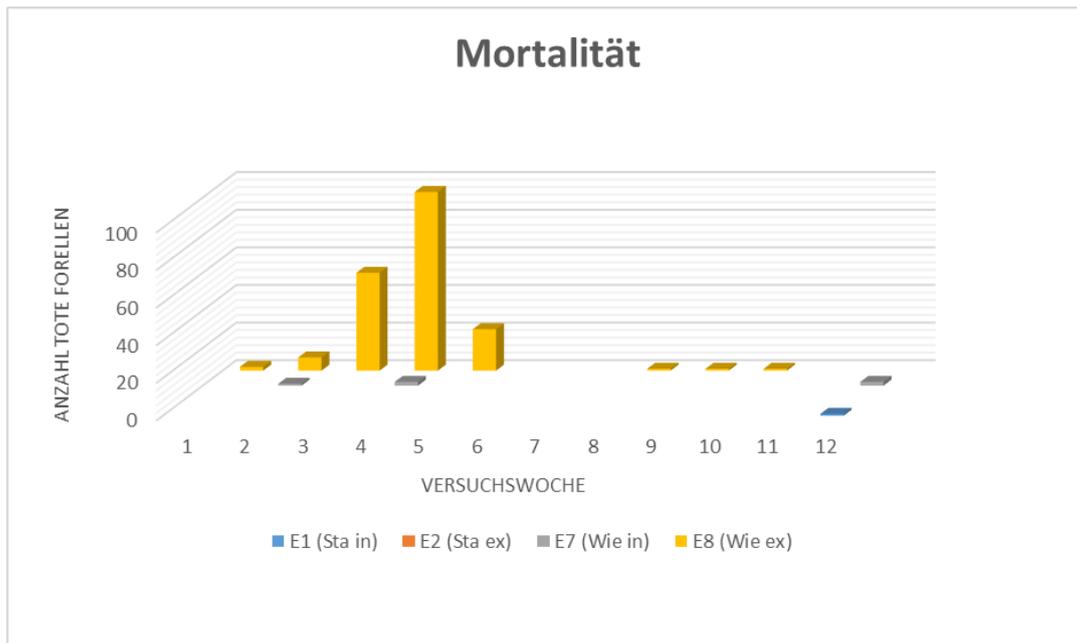


Abbildung 17 Gesamte Mortalität bei Regenbogenforellen aus dem Praxisversuch mit unterschiedlichen Besatzdichten. Angegeben ist jeweils die Gesamtzahl toter Forellen in Versuchswoche 1 bis 12. Sta = Starnberg; Wie = Wielenbach; in = intensiv; ex = extensiv; E bezeichnet die Teiche 1, 2 und 7 und 8. Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg) erhoben.

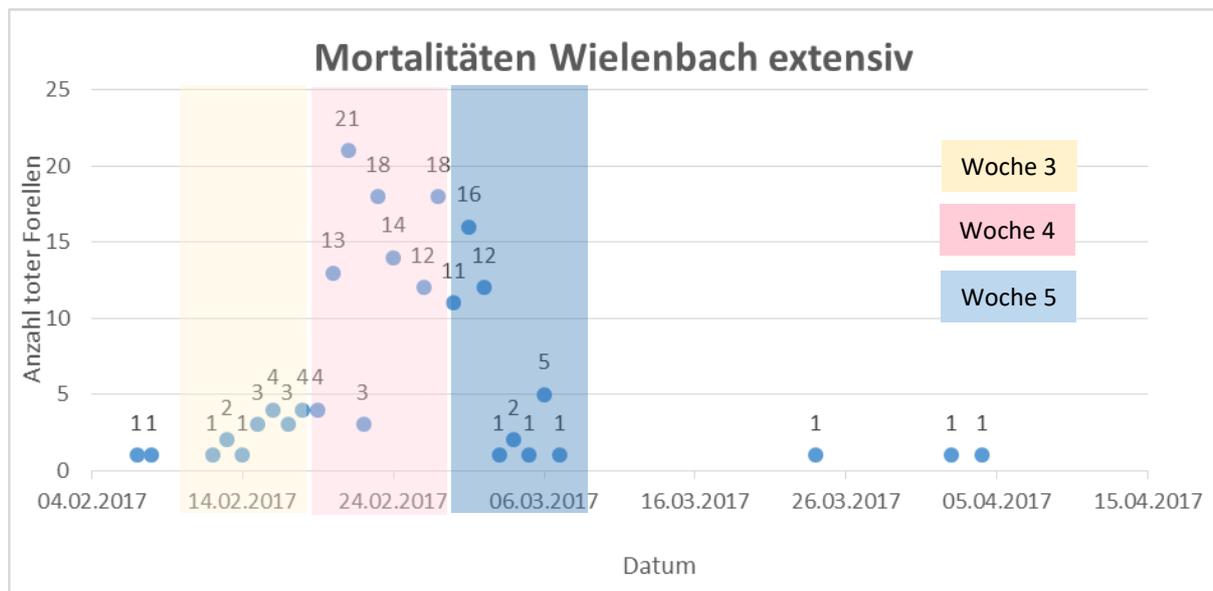


Abbildung 18 Anzahl toter Wielenbach-Forellen aus der extensiven Haltung nach Versuchstagen. Angegeben ist jeweils die Anzahl toter Forellen zu bestimmten Zeitpunkten. Die Zahl an den Punkten beschreibt die genaue Zahl. Die Zeiträume der 3. bis 5. Versuchswoche wurden farblich markiert. Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg) erhoben.

4.2.3 Wachstums- und Performanceparameter

Wachstumsparameter sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die Fütterungsmenge wurde nach den Zwischenwiegungen angepasst, so dass gegen Anfang des Versuchs von 1,20 % KG auf 0,90 % KG reduziert wurde (siehe dazu Tabelle 2, Seite 33), auch um die nach der Öko-VO maximale Besatzdichte von 25 kg/m³ in den Teichen nicht zu überschreiten.

Während des Versuchszeitraums (insgesamt 12 Wochen) wurde in beiden Herkünften unabhängig der Besatzdichte insgesamt eine konsequente Gewichtszunahme der Fische beobachtet (Abbildung 19 und Abbildung 20). Bedingt durch die Mortalitäten bei den extensiv gehaltenen Wielenbach-Forellen findet sich bei der Zwischenwaage am 03.03.2017 ein Einbruch in der Kurve in Abbildung 20.

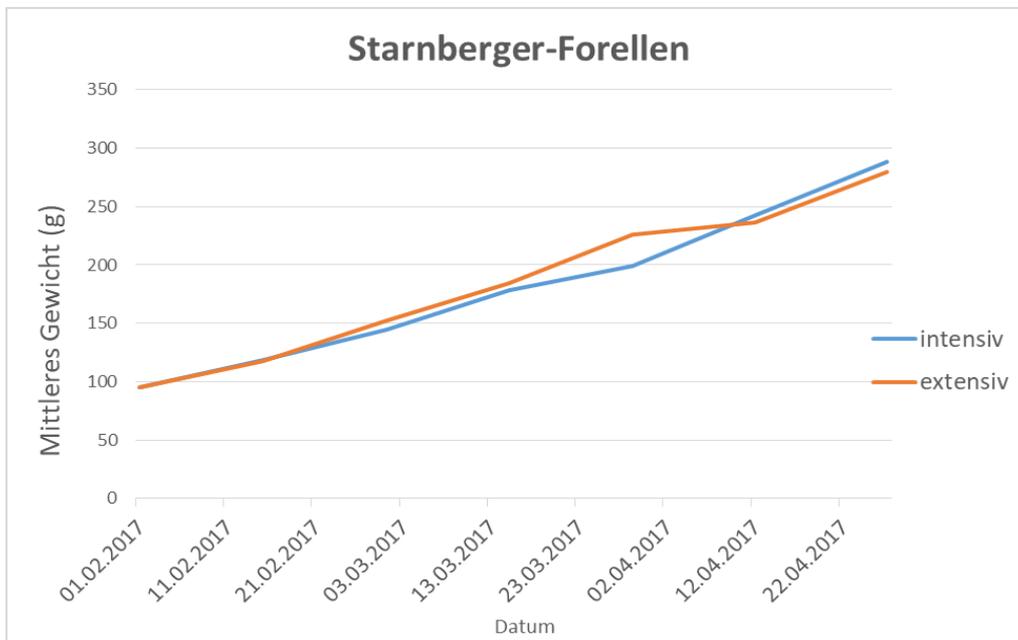


Abbildung 19 Durchschnittliches Gewicht der Regenbogenforellen aus Starnberg. Dargestellt ist das mittlere Gewicht im Verlauf des Versuchszeitraums von 84 Tagen für die beiden unterschiedlichen Besatzdichten: intensiv (initial 7,62 kg/m³; final 22,95 kg/m³) und extensiv (initial 2,0 kg/m³; final 5,83 kg/m³). Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg, Deutschland) erhoben. n = 100.

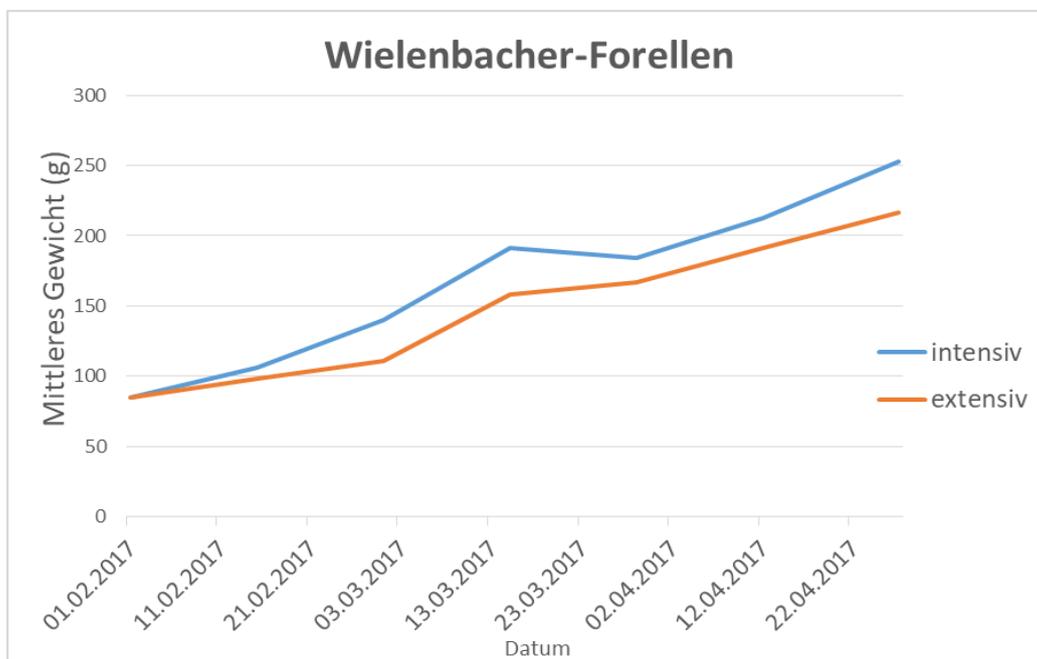


Abbildung 20 Durchschnittliches Gewicht der Regenbogenforellen aus Wielenbach. Dargestellt ist das mittlere Gewicht im Verlauf des Versuchszeitraums von 84 Tagen für die beiden unterschiedlichen Besatzdichten: intensiv (initial 7,62 kg/m³; final 18,19 kg/m³) und extensiv (initial 2,0 kg/m³; final 5,91 kg/m³). Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg, Deutschland) erhoben. n = 100.

Das individuelle Gewicht in den Gruppen hat sich über die Probezeit verdreifacht mit Ausnahme der „Wie ex“, die nur das 2,5-fache an Gewicht zugenommen haben. Das endgültige Einzelgewicht der Wielenbach-Forellen war etwas geringer als das der Starnberger-Forellen. Unterschiede in den mittleren Endgewichten waren zwischen beiden Gruppen nicht signifikant.

Das gesamte Erntegewicht der intensiv gehaltenen Starnberger Forellen (726 kg) war dreimal so hoch wie das Erntegewicht der extensiv gehaltenen Starnberg-Forellen (227,3 kg), während das Erntegewicht der „Wie in“ (575,5 kg) im Vergleich zu den „Wie ex“ (230,6 kg) – auch wegen der Verluste in der 2. bis 5. Versuchswoche – nur 2,5-mal so hoch war. Die spezifische Wachstumsrate war bei „Sta in“ am besten und bei „Wie ex“ am schlechtesten (Tabelle 8). Der Konditionsfaktor lag bei allen Forellen über dem normalen Durchschnitt für Regenbogenforellen (1,0 bis 1,1) und auch der Futterquotient weist mit < 1,0 in allen Gruppen darauf hin, dass das Futter sehr gut verstoffwechselt werden konnte.

Bei Versuchsende fand sich bei „Sta in“ eine Besatzdichte von 22,95 kg/ m³, bei „Sta ex“ von 5,83 kg/ m³, bei „Wie in“ von 18,19 kg/ m³ und bei „Wie ex“ von 5,91 kg/ m³.

Tabelle 8 Wachstums- und Performanceleistung der untersuchten Regenbogenforellen des Praxisversuchs. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der Haltungsgruppen für das durchschnittliche Initial- und Endgewicht (g, n = 50) eines Fisches, der Fulton'sche Konditionsfaktor (K, dimensionslos, n = 50), der Futterquotient (FQ, dimensionslos, n = 50) und die spezifische Wachstumsrate (SWR, %/ d, n = 50). Sta = Starnberg; Wie = Wielenbach; in = intensiv; ex = extensiv; E bezeichnet die Teiche 1, 2 und 7 und 8. Die Rohdaten wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Starnberg) erhoben.

	E1 (Sta in)	E2 (Sta ex)	E7 (Wie in)	E8 (Wie ex)
Initialgewicht [g]	95,4 ± 18,4	95,4 ± 18,4	84,6 ± 14,5	84,6 ± 14,5
Endgewicht [g]	288,3 ± 50,8	279,9 ± 42,9	253,0 ± 38,7	216,6 ± 39,7
K	1,33	1,30	1,25	1,36
FQ	0,77	0,84	0,86	0,95
SWR [%/ d]	1,31 ± 0,27	1,29 ± 0,53	1,29 ± 0,89	1,11 ± 0,74

4.2.4 Blutparameter

4.2.4.1 Hämatokrit

Tabelle 9 Hämatokritwerte der untersuchten Regenbogenforellen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Hämatokritwerte (Hkt, %) jeder Haltungsgruppe beim Versuchsstart, der Zwischenbeprobung (V_{zwi}; nach 7 Wochen n = 6), sowie bei der Endbeprobung (V_{end}; nach 12 Wochen n = 6).

	Starnberg	Wielenbach	Starnberg extensiv	Starnberg intensiv	Wielenbach extensiv	Wielenbach intensiv
Hämatokrit Start [%]	34,23 ± 7,80	26,13 ± 9,89				
Hämatokrit V_{zwi} [%]			37,39 ± 5,98	35,03 ± 4,05	32,10 ± 4,79	30,86 ± 7,67
Hämatokrit V_{end} [%]			33,06 ± 2,61	30,89 ± 3,53	34,94 ± 4,97	33,33 ± 2,87

Der Durchschnitt der Hämatokrit-Werte lag zwischen 26,13 ± 9,89 % (Mittelwert ± S.D.) und 37,39 ± 5,98 %. Er war am höchsten bei den intensiv gehaltenen Starnberg-Forellen zum nach 7 Wochen und am niedrigsten bei den intensiv gehaltenen Wielenbacher-Forellen zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung. Die Wielenbacher-Forellen wiesen auch bei der Startbeprobung im Vergleich zu den Starnbergern einen verhältnismäßig niedrigen Hämatokrit auf. Dies ist vermutlich auf das durchschnittliche Startgewicht zurückzuführen,

welches bei den Starnberger-Forellen mit $34,23 \pm 19,14$ g wesentlich höher war als bei den Wielenbacher-Forellen mit $26,13 \pm 9,92$ g. Eine deutliche Korrelation zwischen Gewicht und Hämatokritwert ergab sich nicht ($R^2 = 0,0533$ bei Starnberger- und $0,2565$ bei den Wielenbacher-Forellen, beide in exponentiellen Trend getestet).

4.2.4.2 Molekularbiologische Untersuchungen im Rahmen des Praxisversuchs

Tabelle 10 Im Praxisversuch getestete Gene. Dargestellt sind die getesteten Gene mit Abkürzung. Den ausführlichem Namen und eine kurzer Beschreibung ihrer Funktion und/oder Wirkung finden sich in Kapitel 2.6, Seite 21. Die mRNA Expression wurde mittels light Cycler qrPCR, ARIA MX System quantitativ bestimmt; n. n. = der Primer hat nicht funktioniert; * = es lagen signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede der mRNA Expression zwischen Haltungsgruppen (Starnberg intensiv und extensiv, Wielenbach intensiv und extensiv) vor.

EEF1A	X
ACTB	X
RPS5	X
TLR20	n. n.
IL1β	X
IL4/13	X*
TNFα2	X*
TGFβ	X*
SAA	X
HSP90 AA1β	n. n.
PRF	X*
MPO	X*
MX1	X*
NCCRP1	X*
NOS2	X*

Welche Gene getestet wurden, bezog sich auf die Ergebnisse aus dem Fütterungsversuch. In allen getesteten Haushaltsgenen (EEF1A, RPS5, ACTB) zeigte die mRNA Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen und Beprobungszeitpunkten oder Besatzdichten. Sie wurden mit gNorm stabil getestet. Damit konnten sie zur Normalisierung verwendet werden.

Abbildung 21 bis Abbildung 24 stellen die mRNA Expression der untersuchten Gene graphisch dar. Über die Zeit fanden sich signifikante Veränderungen bei den extensiv gehaltenen Starnberger-Forellen bei MX1 ($p = 0,035$), IL4 ($p = 0,010$), PRF ($p = 0,027$), NOS2 ($p = 0,022$) und SAA ($p = 0,013$), bei den intensiv gehaltenen Starnberger-Forellen bei MX1 ($p = 0,007$), IL4 ($p = 0,036$), STAT1 ($p = 0,009$), MAP3K ($p = 0,019$), NOS2 ($p = 0,000$), MPO ($p = 0,000$), UCP ($p = 0,001$) und SAA ($p = 0,001$), bei den extensiv gehaltenen Wielenbacher-Forellen bei MX1 ($p = 0,059$), IL4 ($p = 0,016$), TNF α 2 ($p = 0,027$), STAT1 ($p = 0,006$), NCCRP ($p = 0,048$), LYG1 ($p = 0,017$) und bei den intensiv gehaltenen Wielenbacher-Forellen fast bei PRF ($p = 0,031$) und signifikant bei TNF α 2 ($p = 0,069$), und SAA ($p = 0,064$).

In den Abbildungen kann man deutlich sehen, dass MX1 bei „Wie ex“ nach 7 Wochen signifikant hochreguliert worden ist und nach 8 Wochen fast gar nicht mehr exprimiert wurde. Das gleiche „Verhalten“ zeigten IL4, TNF α 2, STAT1, MAP3K, NCCRP1, LYG1, USP4, MPO und UCP. Bei SAA ist es genau umgekehrt. Die signifikant höhere mRNA Expression hängt sehr wahrscheinlich mit der erhöhten Mortalität der „Wie ex“ zwischen Woche 3 bis 5 des Untersuchungszeitraums zusammen. Von einer Infektion ist auszugehen. Nach 12 Wochen fand sich keine erhöhte MX1 mRNA Expression mehr und es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor. Viele der Gene werden im Vergleich zwischen extensiv und intensiv gehaltenen Starnberger-Forellen bei den intensiv gehaltenen Forellen

in einer erhöhten Anzahl an Kopien/ μg RNA ausgeschüttet. Dieser Unterschied ist bei SAA nach 7 Wochen fast signifikant ($p = 0,060$) und bei NOS2 signifikant ($p = 0,000$). Bei STAT1, MAP3K, USP4 und MPO ist die mRNA nach 7 Wochen erhöht, auf Grund von hohen Abweichungen vom Mittelwert jedoch nicht signifikant. Dasselbe zeigte sich bei IL4, TGF β , IL1 β , PRF, STAT1, MAP3K, NCCRP1, LYG1, NOS2, USP4 und MPO nach 12 Wochen. Durch die deutliche Herunterregulierung der mRNA Expression der oben genannten – vermutlich durch eine Infektion beeinflussten Gene – ergaben sich verschiedene signifikante oder fast signifikante Unterschiede im Vergleich der „Sta ex“ mit den „Wie ex“ (nach 7 Wochen bei IL1 β , $p = 0,083$; bei NOS2, $p = 0,000$ und bei UCP, $p = 0,059$, sowie nach 12 Wochen bei IL4, $p = 0,059$; bei NCCRP1, $p = 0,041$ und LYG1, $p = 0,049$). Beim Vergleich der „Sta in“ mit den „Wie in“ fand sich ein signifikanter oder fast signifikanter Unterschied nach 7 Wochen bei IL4 ($p = 0,024$), TNF α ($p = 0,078$), TGF β ($p = 0,032$), IL1 ($p = 0,049$), LYG1 ($p = 0,004$), NOS2 ($p = 0,016$) und SAA ($p = 0,056$).

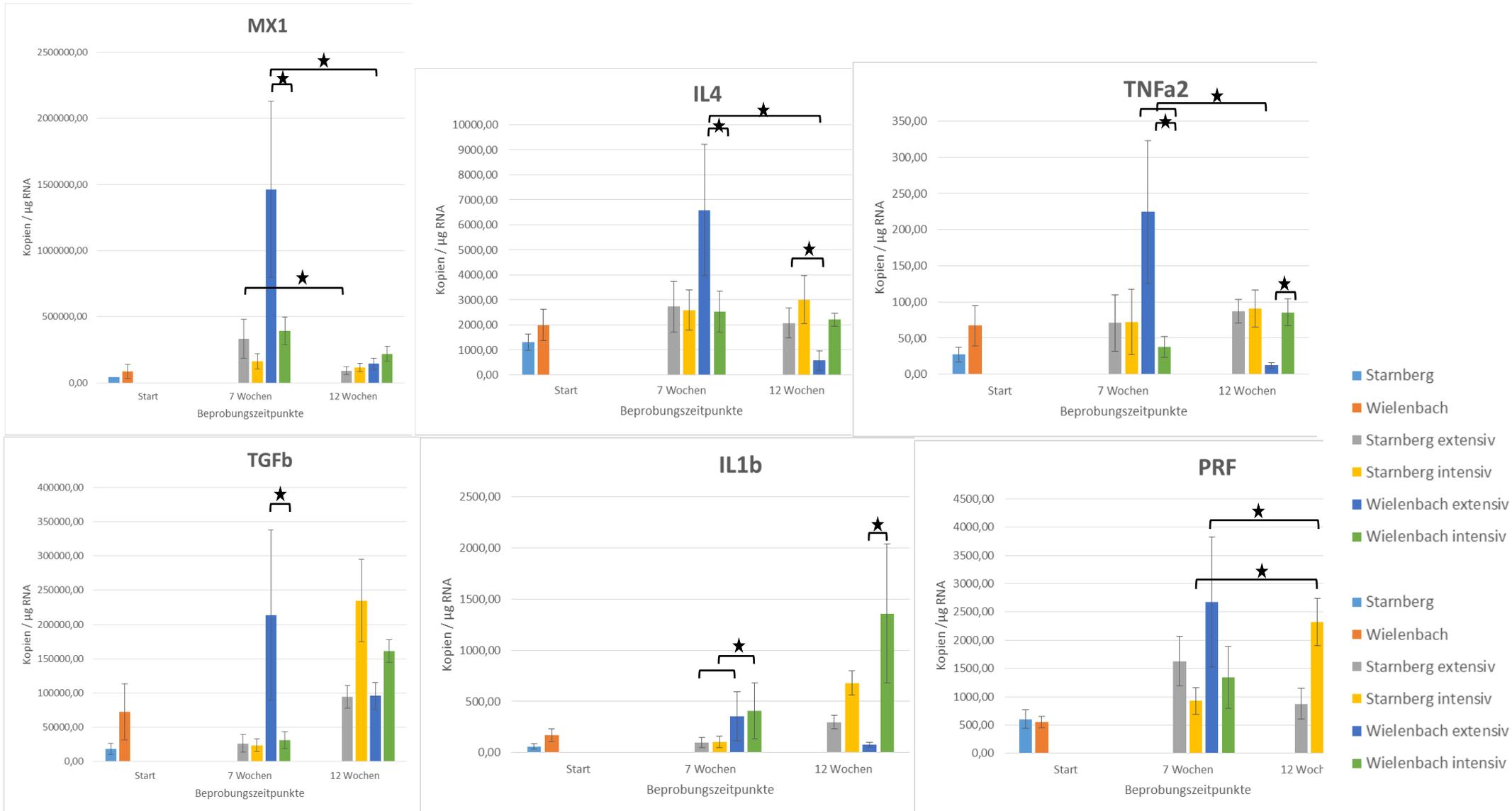


Abbildung 21 Im Praxisversuch getestete Gene I. Dargestellt ist die normalisierte mRNA Expression vom Myxovirus 1 (MX1), Interleukin 4 (IL4), Tumor Nekrose Faktor $\alpha 2$ (TNFa2), Tumor Growth Faktor β (TGFb), Interleukin 1 β (IL1b) und Perforin (PRF) für die unterschiedlichen Haltungsgruppen zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Einzelne statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels Balken und wenn $p \leq 0,05$ mittel Stern gekennzeichnet.

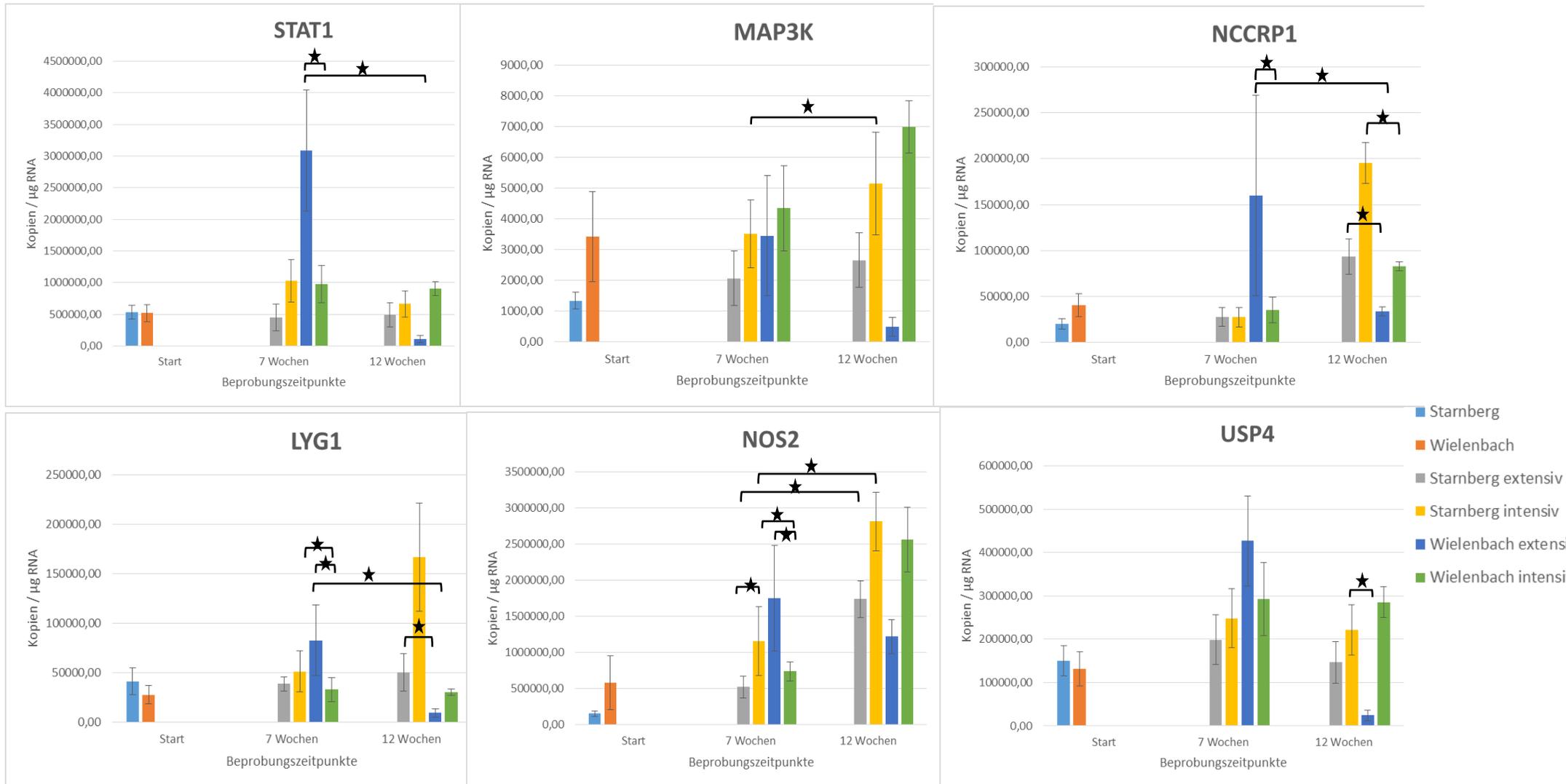


Abbildung 22 Im Praxisversuch getestete Gene II. Dargestellt ist die normalisierte mRNA Expression von STAT1, MAP-3-Kinase (MAP3K), Nicht spezifisches zytotoxisches Zellrezeptor Protein (NCCRP1), Lysozym G1 (LYG1), Stickstoffmonoxid Synthase (NOS2) und Ubiquitin spezifische Protease 4 (USP4) für die unterschiedlichen Haltungsguppen zu drei verschiedenen Zeitpunkten (n = 6). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Einzelne statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels Balken und wenn $p \leq 0,05$ mittel Stern gekennzeichnet.

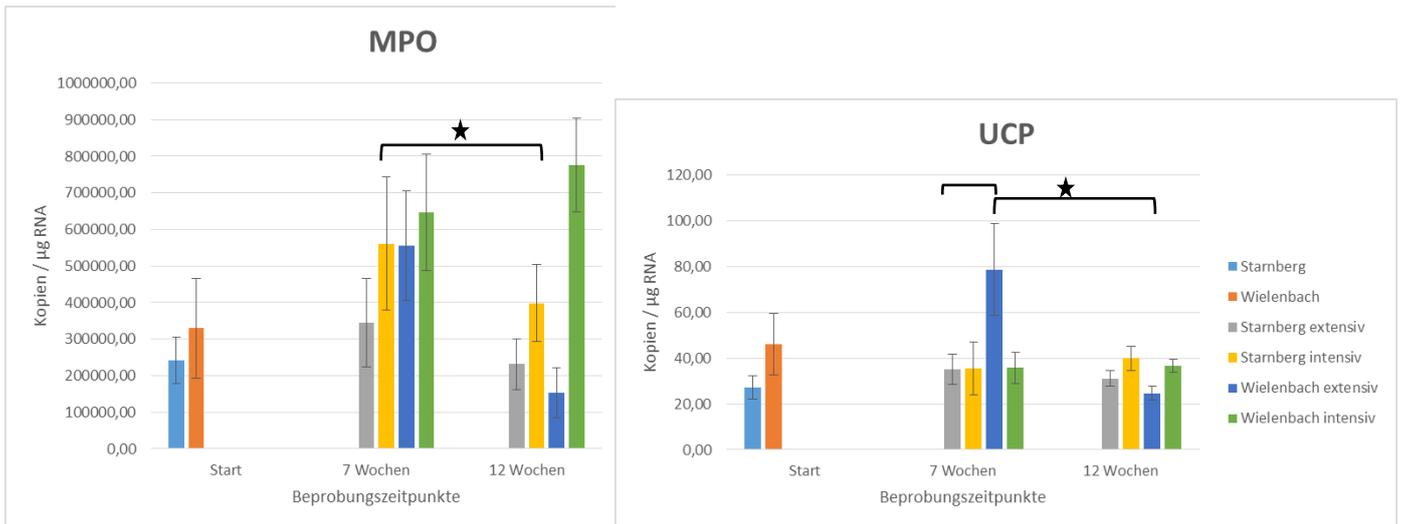


Abbildung 23 Im Praxisversuch getestete Gene III. Dargestellt ist die normalisierte mRNA Expression der Myeloperoxidase (MPO) und des Mitochondralen Uncoupling Proteine (UCP) für die unterschiedlichen Haltungsgruppen zu drei verschiedenen Zeitpunkten (n=6). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Einzelne statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels Balken und wenn $p \leq 0,05$ mittel Stern gekennzeichnet.

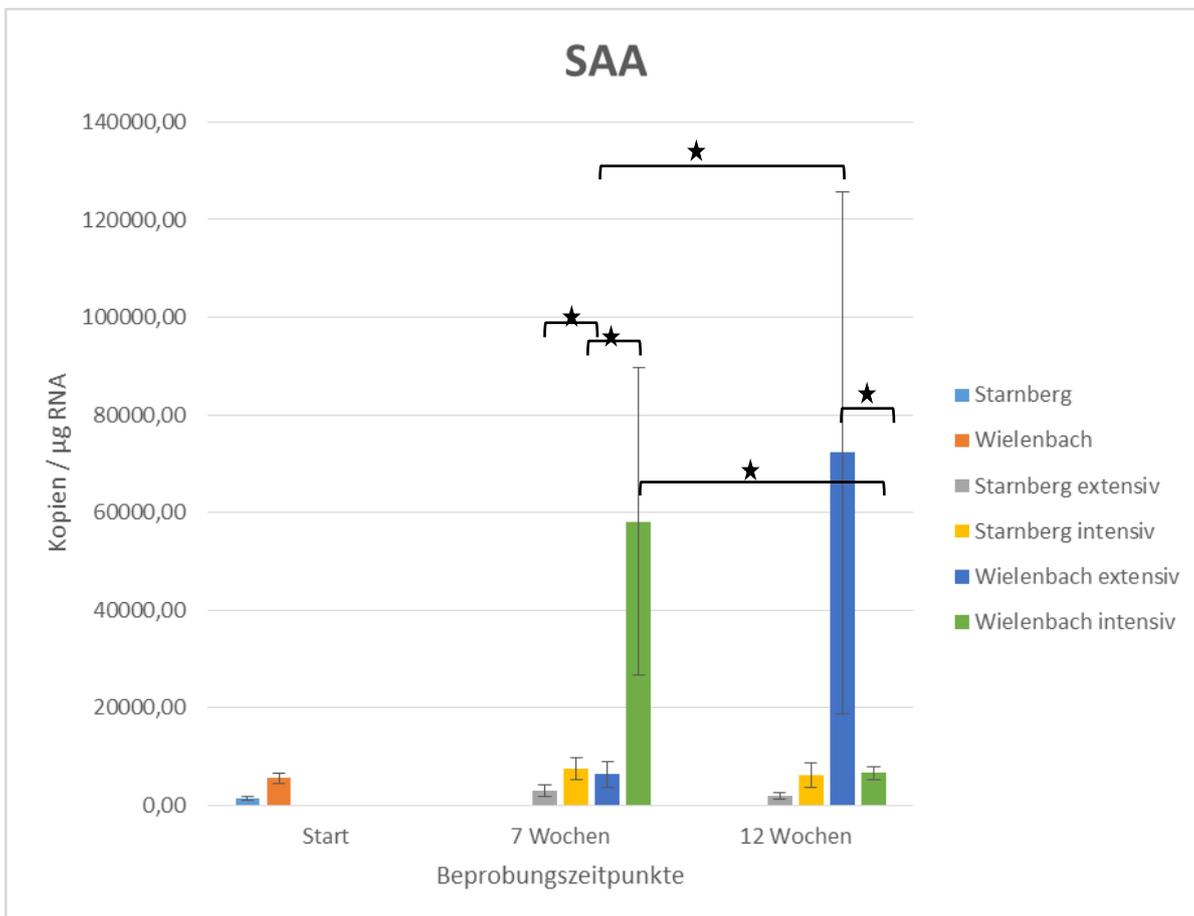


Abbildung 24 Darstellung der normalisierten mRNA Expression von Serum Amyloid A aus dem Praxisversuch. Dargestellt sind die unterschiedlichen Haltungsgruppen zu drei verschiedenen Zeitpunkten (n=6). Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Die Balken stellen die mittlere Abweichung vom Mittelwert dar. Einzelne statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels Balken und wenn $p \leq 0,05$ mittel Stern gekennzeichnet.

5 Diskussion der Ergebnisse

Ganz allgemein, zusammenfassend, konnte in diesem Projekt gezeigt werden, dass der Nachweis verschiedener molekularer Marker, die auf Stress oder Schäden der Forelle, z. B. durch Entzündungen hinweisen, minimal invasiv aus Blut auch am lebenden Fisch möglich ist und dass diese einen wichtigen Mehrwert zur Einschätzung des Wohlbefindens bieten können. Bisherige Stressforschungen beziehen sich auf die Untersuchung von Organen (Leber, Milz, Kopfniere), wozu die Tötung des Tieres unabdingbar ist, sofern diese Studien überhaupt molekularbiologische Marker untersuchen. Auch in aktuellen Studien zur Einschätzung von Stress liegt der Schwerpunkt immer noch auf eher schwer objektivierbaren Parametern wie bspw. dem Schwimmverhalten. Klassische Parameter, die immer noch standardmäßig im Rahmen von Stressuntersuchungen erhoben werden, sind Cortisolgehalte (Stresshormon der akuten Stressantwort), Hämatokrit, Laktat, Glukosegehalte oder ein Differentialblutbild.

Auf Grund der Fragestellung des Projektes werden am Ende der Diskussion folgende **Fragestellungen** beantwortet:

- (1) Was ist im Allgemeinen bei Stressuntersuchungen bei Forellen zu beachten?
- (2) Welche der untersuchten chronischen Stressparameter eignen sich zur Definition und zum Monitoring des „welfare“-Status bei Forellen?
- (3) Können „überordnete“ von in der Stresskaskade „nachgestellten“ Stressmarkern unterschieden werden?
- (4) Wie ist das Verhältnis der Stressparameter am Anfang der Stresskette zu den Parametern am Ende der Stresskette?
- (5) Welche Korrelationen bestehen zwischen den untersuchten Stressparametern?
- (6) Sind die etablierten Stressmarker valide und praxistauglich?
- (7) Welche Vor-/Nachteile bieten sie in Bezug auf „konventionelle Marker“ wie Hämatokrit oder das Differentialblutbild?
- (8) Wie steht der akute Stressmarker Cortisol zu den neu etablierten „Markern“?
- (9) Gibt es Unterschiede in der Stressresistenz und Anpassungsfähigkeit von Starnberger- und Wielenbacher-Forellen, die unter ökologisch intensiven und extensiven Haltungsdichten in Bezug auf die vorgeschriebenen ökologischen Haltungsbedingungen gehalten wurden?
 - Liegen bei der unterschiedlichen Anpassungsfähigkeit der Starnberger- und Wielenbacher-Forellen Unterschiede in der Stressverarbeitung vor?
 - Gibt es tatsächlich Unterschiede in der Stressresistenz zwischen beiden Herkünften?
 - Oder handelt es sich um eine Adaptation anderer, z. B. vermutlich genetischer, Art?
 - Welche der beiden Herkünfte ist stressresistenter?
- (10) Welche Empfehlungen können für ein tiergerechtes Verfahren in der Forellenproduktion gegeben werden?

5.1 Fütterungsversuch mit Sojabohnenmehl

Als Modell zur Erzeugung von Stress in unterschiedlichem Grad wurde ein Fütterungsversuch mit verschiedenen hohen Anteilen an Sojabohnenmehl gewählt, da diese Art von Stress besser zu standardisieren ist, als bspw. Handlingstress. Neben molekularen Stressmarkern wurden der Cortisolgehalt, Hämatokrit (Hkt) und das Differentialblutbild als „konventionelle“ Stressparameter erhoben. Darüber hinaus wurde die Wasserqualität während des Versuchs, das Verhalten der Forellen, die Wachstums- und Performanceleistung und die quantitative Nährstoffzusammensetzung des Fischkörpers untersucht, um diese Daten mit Veränderungen in der mRNA Expression miteinander in

Beziehung zu setzen und die klassischen Parameter zur Beschreibung von Stress, wie sie in der Literatur oft angeführt werden näher zu beleuchten.

Die Versuchsergebnisse belegen, dass die steigende Substitution von Fischmehl durch Sojabohnenmehl in der Ernährung von Regenbogenforellen zu Fütterungsstress, schlechteren Wachstumsergebnissen, einem reduzierten Gesundheitsstatus und einem tendenziell gestiegenen Stressstatus geführt hat und damit das Modell geeignet ist. Hervorgerufen wurde der Stress sehr wahrscheinlich in erster Linie durch entzündliche Veränderungen im Darm. Dies konnte auch histo-pathologische bestätigt werden. Die morphologischen, histologischen Veränderungen stimmten mit Veränderungen überein, die bei Salmoniden auftreten, die mit Sojamehl-Diäten gefüttert wurden und das Krankheitsbild der SBMIE^{44,45,83} entwickelten. Ab Tag 10 wurde auch klinisch bei SBM66 vereinzelt, geringgradiger und bei SBM100 mittelgradiger Durchfall beobachtet, der bei SBM33 erst ab Tag 14 und nur sehr vereinzelt auftrat. Die in der aktuellen Bewertung beobachteten Veränderungen waren jedoch milder im Vergleich zu anderen Studien zur SBMIE, als bei derart hohen SBM Austauschraten zu erwarten gewesen wäre. Mortalitäten traten während des Versuchszeitraumes nicht auf, jedoch konnte in allen Versuchsgruppen ein starkes Auseinanderwachsen der Fische beobachtet werden.

Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse, dass Daten zu Wachstumsparametern, Cortisol, Hämatokrit und Blutbild allein betrachtet keine validen Stressmarker darstellen, da sie zum einen großen individuellen Schwankungen unterliegen und zum anderen teilweise vom Gewicht des Untersuchungstieres abhängig sein können.

5.1.1 Einfluss von chronischem Stress auf die Bildung von Cortisol

Ein zunehmender Anteil von Sojabohnenmehl im Futtermittel führte tendenziell zu einem Anstieg der Cortisolkonzentration. Dies zeigte sich besonders deutlich in der Zwischenbeprobung, bei der die Gruppe CD ($4,93 \pm 2,82$ ng/ mL) deutlich niedrigere Cortisolgehalte als die Gruppe SBM100 ($13,05 \pm 21,94$ ng/ mL) aufwies. Der Anstieg der Cortisolgehalte kann u. a. auf den steigenden Anteil an unverdaulichen Kohlenhydraten und antinutritiven Inhaltsstoffen im Futtermittel zurückgeführt werden, welche die Nährstoffversorgung bzw. Nährstoffverwertung von karnivoren Fischarten negativ beeinflussen⁴³. Ein Anzeichen für den negativen Effekt dieser Bestandteile bzw. eines Nährstoffmangels lieferten in der vorliegenden Studie die erhobenen Wachstumsergebnisse, welche sich mit steigenden Sojaanteilen verringerten (vgl. Kapitel 5.2, Seite 70). Die Auswirkungen von Nährstoffmangel auf die Stressphysiologie von karnivoren Fischen wurden bereits in vorherigen Studien untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von mangelhaften, unausgewogenen Futtermitteln oder hohen Mengen an Kohlenhydraten zu einer stressinduzierten Sekretion von Cortisol führen^{46,84,85}. Aufgrund der Durchfälle werden die Nährstoffe aus dem Futter nicht adäquat aufgenommen, wodurch es ebenfalls zu einem Nährstoffmangel und einer damit verbundenen Stressreaktion kommen kann⁴⁷.

Da auch die Kontrollgruppe ($V_{zwi} = 04,93 \pm 2,82$ ng/ mL; $V_{end} = 3,42 \pm 3,90$ ng/ mL) im Vergleich zur Initialbeprobung ($V_0 = 2,6 \pm 0,53$ ng/ mL) tendenziell erhöhte Cortisolwerte aufwies ist ein Vorliegen weiterer Stressoren nicht ausgeschlossen. Hierbei ist vor allem Stress, hervorgerufen durch individuelle Interaktionen zwischen den Forellen und der festgestellten biologischen Belastung des Haltungsmediums denkbar. Nach bisherigen Erkenntnissen ist unklar, ob die biologische Belastung bei ansonsten optimalen Wasserparametern einen direkten Einfluss auf den Stresszustand von Fischen nimmt^{42,86}. Der indirekte Einfluss auf den Stressstatus der Fische durch die regelmäßigen Instandhaltungsmaßnahmen (Wasserwechsel, Modulputz) in den Haltungsbecken ist vorstellbar. Dagegen dürfte der Einfluss von Routinearbeiten vor den Becken durch den Einsatz der Spiegelspionfolien als gering eingeschätzt werden können. Die Untersuchung zeigte zudem eine Veränderung der Cortisolkonzentration über den gesamten Versuchszeitraum. Dabei wiesen alle vier Fütterungsgruppen zunächst deutlich erhöhte

Cortisolwerte bei der Zwischenbeprobung auf, während bei der Endbeprobung die Werte tendenziell niedriger waren. Dies zeigte sich besonders deutlich bei der Gruppe SBM100, deren Cortisolkonzentration mit $13,05 \pm 21,94$ ng/ mL bei der Zwischenbeprobung deutlich höher war, als bei der Endbeprobung mit Werten von $6,37 \pm 8,00$ ng/ mL. Nach dem 'Allgemeinen Anpassungssyndrom' von Selye kann der beobachtete Cortisolverlauf auf ein typisches adaptives Reaktionsmuster nach chronischer Stresseinwirkung hinweisen⁸⁷. Dabei kann der Rückgang des Stresshormons auf eine Erschöpfung der Energiereserven der Cortisol-bildenden Zellen der Fische hindeuten. Innerhalb dieser Erschöpfungsphase sind die Abwehrkräfte der Fische stark geschwächt, wodurch die in den letzten Wochen vermehrt beobachtete Anfälligkeit der Fische für Pilzinfektionen zu erklären wäre.

Die alleinige Messung der Cortisolkonzentration hat eine fragliche Aussagekraft, da die Cortisolwerte der einzelnen Fische innerhalb einer Fütterungsgruppe deutliche individuelle Unterschiede aufwiesen, sowie deutliche Tages- und Jahreszeitliche Schwankungen beschrieben sind^{13,88}. Hohe individuelle Schwankungen der Cortisolwerte sind bereits aus vorherigen Studien bekannt⁸⁹⁻⁹¹. Ein möglicher Grund für die teils erheblichen Unterschiede könnten die beobachteten Rangordnungskämpfe (sozialer Stress) innerhalb der Gruppen sein, welche bei juvenilen Forellen - auf Grund des aggressiven und territorialen Verhaltens - sowohl im natürlichen Lebensraum als auch unter experimentellen Bedingungen schon oft beschrieben wurden^{17,18,92}. In zwei anderen Studien^{36,93} berichten die Autoren, dass subdominante Tiere, neben einer reduzierten Futteraufnahme und einem folglich geringerem Wachstum, einen höheren Stressstatus als dominanterer Artgenossen aufweisen. Zudem können sich dominanterer Artgenossen schneller an Stresssituationen adaptieren als kleinere, rangniedrigere Fische⁹⁴. Anhand des Körpergewichtes, welches häufig als Anhaltspunkt für den hierarchischen Rang von untersuchten Fischen dient, konnte kein signifikanter Zusammenhang zum Cortisolgehalt festgestellt werden. Dabei fielen unabhängig vom Körpergewicht vereinzelt Forellen durch einen besonders erhöhten Cortisolgehalt auf, welcher vermutlich auf das Besetzen und die Aufrechterhaltung eines dominanten bzw. subdominanten Status in der Dominanz-basierten-Sozialstruktur der Fische zurückzuführen ist^{36,95}.

Durch die konstante Abfolge der Beprobung und die gleichzeitige Entnahme der untersuchten Fische, kann der Einfluss der Probenahme auf die individuelle Stressantwort der Fische als niedrig eingeschätzt werden. Zudem zeigten die Ergebnisse, dass die benötigte Zeitdauer bis zur Betäubung (meist wenige Sekunden nach dem Keschern) keinen Einfluss auf die Cortisolwerte besaß. Vergleichbares konnten Sumpter et al.¹³ zeigen. Die Autoren berichten, dass eine stressbedingte Sekretion von Cortisol zeitverzögert, die erst 5 bis 6 min nach Auftreten des Stressors, eintrat. Weiterhin können durch tageszeitlich konstante Probenahmen und einem im Versuchsverlauf künstlich geregelten Lichtregime eine Beeinflussung der Cortisolkonzentration durch zirkadiane Schwankungen des Cortisolgehaltes ausgeschlossen werden. Eine Beeinflussung der Cortisolkonzentration auf Grund der Aufbereitung / Analyse der Proben wird ebenfalls ausgeschlossen, da alle Proben synchron und auf die gleiche Art und Weise von der gleichen Person bearbeitet wurden.

Für weiterführende Untersuchungen wäre es interessant in kürzeren Zeitintervallen Beprobungen vorzunehmen, da die in diesem Versuch durchgeführten drei Einzelbeprobungen keine definitive Bestimmung des Cortisolmaximums oder des Adaptionszeitpunktes zulassen. Dies ist jedoch aus dem Blut nur mittels einer Katheterisierung oder indirekt durch die Bestimmung des Cortisols im Haltungsmodul möglich, da permanenter Handlingstress bei der Blutabnahme vermieden werden muss und somit sowohl technisch, tierschutzrechtlich und finanziell sehr anspruchsvoll ist.

Auf Grund der beschriebenen Problematik wurde auf die Bestimmung von Cortisol im Praxisversuch verzichtet.

5.1.2 Einfluss von chronischem Stress auf die Hämatologie

Die Untersuchungsergebnisse der Blutparameter zeigten über den gesamten Versuchszeitraum des Fütterungsversuchs bei allen Gruppen tendenzielle Veränderungen des Hämatokritwertes. Dieser besaß bei Versuchsbeginn einen Wert von $22,13 \pm 3,36$ % und bewegte sich in dem von vergleichbaren Studien angegebenen Referenzbereich für ungestresste Regenbogenforellen von 25-35 %^{96,97}. Im Vergleich zum Ausgangswert stiegen die Hämatokritwerte bei den Gruppen CD, SBM33 und SBM66 zur Zwischenbeprobung tendenziell mit zunehmendem SBM-Anteil an, während die Gruppe SBM100 ($22,67 \pm 9,50$ %) auf dem Niveau des Ausgangswertes verblieb. Ein Anstieg des Hämatokritwertes wurde bereits in einer Studie infolge einer sojahaltigen Ernährung beschrieben und kann auf die erhöhte Cortisolkonzentration zurückgeführt werden⁹⁸. Darüber hinaus kann eine stressbedingte Cortisolausschüttung bei Regenbogenforellen zu einer Kontraktion der Milz führen, die daraufhin die gespeicherten Erythrozyten ins periphere Blut ausschüttet und somit einen gesteigerten Hämatokritwert bewirkt⁹⁹. In Übereinstimmung mit dem Rückgang der Cortisolkonzentration konnten zum Ende des Fütterungsversuches deutlich niedrigere Hämatokritwerte dokumentiert werden. Dies zeigte sich besonders deutlich bei der Gruppe CD, die bei der Zwischenbeprobung höhere Werte ($30,33 \pm 6,17$ %) als bei der Endbeprobung ($23,39 \pm 4,50$ %) aufwies. Das auch die Kontrollgruppe CD im Vergleich zur Initialbeprobung einen tendenziell erhöhten Hämatokritwert aufwies, könnte, wie bereits in Abschnitt 5.1.1 Seite 64 diskutiert, auf das Vorliegen eines unspezifischen Stressors hindeuten. Der konstante Hämatokritwert der Gruppe SBM100 bei der Zwischenbeprobung kann auf einen signifikanten Einfluss des individuellen Körpergewichts der Fische zurückgeführt werden. In dieser Gruppe wurden im Vergleich zu den übrigen Gruppen sehr kleine Fische beprobt, deren Körpergewicht unterhalb des durchschnittlich berechneten Gruppenmittels lagen. Größere Fische, aber auch deutlich aktivere Fische, haben einen höheren Sauerstoffbedarf in den Muskeln, der in der Niere zu einer Stimulierung der Erythropoese führen kann^{100,101}. Demzufolge ist es denkbar, dass im Vergleich zu den anderen Gruppen eine geringere Körpergröße bei einzelnen Individuen der Gruppe SBM100 zu einem unveränderten Hämatokritwert beigetragen hat. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl die erhöhte Cortisolkonzentration bei der Zwischenbeprobung als auch die individuellen Körpergewichte der Regenbogenforellen einen Einfluss auf die Freisetzung von Erythrozyten ins Blut und somit folglich auf den Hämatokritwert besaßen.

Im Praxisversuch schwankten die Hämatokritwerte zwischen $26,13 \pm 9,89$ % (Start „Wie“) und $35,03 \pm 4,05$ % (Vzwi „Sta in“). Während der Hkt bei den Starnberger-Forellen zur Zwischenbeprobung anstieg und zum Ende sogar noch unter den Wert der Startbeprobung abfiel und dies bei „Sta in“ deutlicher als bei „Sta ex“, stieg der Hkt bei den Wielenbacher-Forellen kontinuierlich bis Versuchsende an und erreichte bei „Wie ex“ den höchsten Wert. Letzteres ist möglicherweise über einen erhöhten Stress durch die Infektion (vgl. Kapitel 5.3, Seite 71) ausgelöst worden. Cortisolwerte wurden im Praxisversuch nicht erhoben, denn auf Grund der Korrelation mit dem Gewicht wäre sonst erwartet worden, dass gegen Ende des Versuchs die durchschnittlich schwereren „Wie in“ den höheren Hkt-Wert aufweisen.

Die periphere Blutzellzusammensetzung der mit SBM-haltigen Futtermitteln gefütterten Tiere ließ nur marginale, nicht signifikante Unterschiede gegenüber denen der Kontrolltiere erkennen. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen zweiter Studien, denen zufolge SBM in der Ernährung von Katzenwelsen (*Ictalurus punctatus* G.) und japanischen Flundern (*Paralichthys olivaceus* T.) keinen Einfluss auf das weiße Blutbild besaß^{102,103}. Allerdings zeigte sich, dass über den Versuchszeitraum bei allen Gruppen eine tendenzielle simultane Veränderung der zellulären Blutzusammensetzung auftrat. Diese kennzeichnete sich durch eine Abnahme des prozentualen Anteils an Lymphozyten, bei gleichzeitigem Anstieg der relativen Anteile an Monozyten, basophilen und neutrophilen Granulozyten bei der Zwischenbeprobung. Entsprechend den Untersuchungen von Weyts et al. deuten die gesunkenen Anteile an Lymphozyten, bei gleichzeitig gestiegenen Granulozyten- und Monozytenanteilen auf das Vorliegen einer Stresssituation hin^{104–106}. Dies

weist unabhängig vom SBM-Einsatz auf das Bestehen eines unspezifischen Stressors hin. Dem Glucocorticoid Cortisol wird in der Literatur eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation von Lymphozyten^{14,107} und Induktion der Apoptose von Granulozyten¹⁰⁶ zugeschrieben. Ein erhöhter Cortisolgehalt induziert zudem eine Emigration der Monozyten und neutrophilen Granulozyten aus dem hämatopoetischen Gewebe der Niere ins periphere Blut¹⁰⁸. In Übereinstimmung mit dem Rückgang der Cortisolkonzentration konnte zum Ende des Fütterungsversuches ein Rückgang der neutrophilen Granulozyten und ein leichter erneuter Anstieg der Lymphozyten in den Gruppen CD, SBM33 und SBM100 dokumentiert werden. Während es in Diskrepanz dazu, zu einem weiteren Rückgang der Lymphozyten in Gruppe SBM66 kam. Besondere Auffälligkeiten in Bezug auf das Auftreten von Krankheiten, des Körpergewichtes oder der Prozedur der Probennahme konnten bei dieser Gruppe nicht belegt werden, wodurch eine weitere Abnahme der Lymphozyten trotz Rückgang des Cortisols nicht geklärt werden konnte.

Ebenfalls in Diskrepanz zum Rückgang der Cortisolkonzentration, stagnierten die basophilen Granulozyten und die Monozyten bei allen Gruppen auf dem Niveau der Zwischenbeprobung. Gründe für die erhöhten Anteile dieser zellulären Bestandteile können neben Stress vor allem durch Parasiten verursachte Infektionen sein¹⁰⁹. Diese werden jedoch weitgehend ausgeschlossen, da weder vor dem Versuch noch während des Versuchszeitraumes Anzeichen für Parasiten-Infektionen nachgewiesen wurden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Übereinstimmung mit dem Rückgang der Cortisolkonzentration ein Rückgang der eosinophilen Granulozyten verzeichnet wurde, dieser lag am Ende des Versuches jedoch unter dem Ausgangswert (pre-Stress-Level) der bei Versuchsstart beprobten Fische. Häufig kann eine ausgeprägte Verminderung der eosinophilen Granulozyten bei Säugetieren oder bei Fischen auf eine Parasiteninfektion oder auf eine Allergen-Exposition zurückgeführt werden¹⁰⁹. Wie bereits erwähnt, können jedoch Parasiteninfektionen weitgehend ausgeschlossen werden. Ebenfalls sind Überempfindlichkeitsreaktionen durch Inhaltsstoffe des SBM auszuschließen, da die Veränderungen der eosinophilen Granulozyten gruppenübergreifend gleich waren und somit auch bei der Gruppe CD auftraten. Das gänzliche Verschwinden der eosinophilen Granulozyten bei der Endbeprobung konnte bislang nicht geklärt werden. Im Hinblick auf die relative Anzahl an Thrombozyten konnte keine Veränderung durch Stress festgestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden von vorherigen Studien, die eine Beeinflussung von Cortisol auf die Thrombozytenanzahl ausschlossen^{31,106}.

5.1.3 Einfluss von SBM auf die mRNA Expression verschiedener Gene in Blut

Es wurde auf die mRNA Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Gene getestet. Da es teilweise große individuelle Unterschiede in der mRNA Expression der einzelnen Gene gab, konnten oftmals Kopienzahlen, die sich auf den ersten Blick deutlich voneinander unterschieden, statistisch nicht als signifikant getestet werden. Obwohl eine Normalisierung sowohl über die Multiplattenanalyse als auch einen Faktor aus drei Haushaltsgenen vorgenommen wie in der Literatur beschrieben vorgenommen wurde, lagen noch immer teils deutliche mittlere Abweichungen vom Mittelwert vor^{53,110,111}. Dies könnte mit den deutlichen Größen- und Gewichtsunterschieden der auseinander gewachsenen beprobten Forellen zusammenhängen. Bei Fischen wird die Immunkompetenz nicht wie bei Säugern durch das Alter, sondern eher durch das Gewicht und damit die Größe beeinflusst⁵².

An Haushaltsgenen wurden *EEF1*, *ACTB* und *RPS5* verwendet. Obwohl Kortner et al. 2011 eine zeitabhängige Induktion der Gene während der Entwicklung einer SBMIE bei Lachse festgestellt hat¹¹², wurden diese drei Haushaltsgene in diesem Versuch mittels *geNorm* und *NormFinder* als stabil getestet und daher hier zur Berechnung eines Korrekturfaktors verwendet.

An regulierten Genen wurden im Blut auf die mRNA Expression von Stoffen der übergeordneten Signaltransduktionswege wie der *SERPIN G* Superfamilie, der intrazelluläre *PI3K/Aktin*-, *Toll-like Rezeptor*-, *NF-κ B*-, *MAP-Kinase*- und *JAK-STAT*-Signaltransduktion und auf intrazelluläre Pathogenerkennungsrezeptoren getestet. Es wurde die mRNA Expression der Blutzellen auf verschiedene pro- und anti-inflammatorische Zytokine,

Chemokine, Stoffe die an der Akuten-Phase-Reaktion oder Komplementkaskade oder an Entzündungsreaktionen beteiligt sind und Hitzeschockproteine getestet. Abschließend wurden verschiedene Markergene für bestimmte Zellpopulation untersucht.

Von den übergeordneten Signaltransduktionswegen wurde die MAP-3-Kinase als Teil des MAP-Kinase Signalweges bei SBM100 signifikant herunterreguliert und dies bereits nach 4 Wochen. Nach 4 Wochen fanden sich signifikante Unterschiede sowohl zwischen CD und SBM100 ($p = 0,000$), zwischen SBM33 und SBM100 ($p = 0,001$) und SBM66 und SBM100 ($p = 0,000$). Nach 8 Wochen lag immer noch ein signifikanter Unterschied zwischen der SBM33- und SBM100-Gruppe ($p = 0,04$) vor. Der Unterschied zwischen SBM66 und SBM100 war mit $p = 0,070$ gerade nicht mehr signifikant. Auch STAT1, als Teil des JAK/STAT Signalweges, war bei SBM100 nach 4 Wochen signifikant herunterreguliert (im Vergleich zu CD, $p = 0,032$; im Vergleich zu SBM33, $p = 0,068$; im Vergleich zu SBM66, $p = 0,010$). STAT1 wurde jedoch nach 8 Wochen wieder vermehrt exprimiert (signifikanter Unterschied bei SBM100-Gruppe zwischen dem Beprobungszeitpunkt nach 4 Wochen und nach 8 Wochen; $p = 0,031$). Ein vergleichbares Muster zeigte sich bei USP4. Es fanden sich signifikante Unterschiede zwischen der SBM66- und der SBM100-Gruppe nach 4 Wochen ($p = 0,015$), wobei SBM100 die geringere Anzahl an Kopien / μg RNA zeigte. USP4 nimmt wichtige Funktion in verschiedenen Signaltransduktionswegen, NF-kB, TGF- β , Wnt/ β -Catenin, p53 und Splicesosome Pathway ein. Möglicherweise ist hier der NF- κ B Weg aktiviert worden, denn auch die mRNA Expression von TLR20 zeigte im Versuchsverlauf mit steigender SBM Supplementation eine steigende Expressierung. TLR20 ist ein Teil der angeborenen Immunabwehr und auch bei Fischen an der Erkennung von spezifischen funktionalen Bestandteilen von Viren, Bakterien und Pilzen beteiligt. Auch bei Fischen wurden verschiedene Toll-like Rezeptoren (TLRs) als spezifische Mustererkennungsmoleküle identifiziert. Von Maus und Mensch weiß man, dass die Stimulation von TLRs zur Aktivierung von NF-kB führt. TLRs sind wichtige Regulatoren sowohl für das angeborene als auch für adaptive Immunreaktionen¹¹³⁻¹¹⁵.

Eine schwerwiegende sekundäre Infektion kann eher ausgeschlossen werden, dass keine Gene aus dem Bereich der intrazellulären Pathogenerkennung wie NOD oder der zugehörige Rezeptor hochreguliert worden sind.

Es wurden verschiedene Entzündungsmarker in der SBM100 nach 8 Wochen im Vergleich zur SBM33 Gruppe signifikant erhöht exprimiert: UCP ($p = 0,0138$), SAA ($p = 0,0791$), MPO ($p = 0,029$) und NOS2 ($p = 0,0312$). Sehr interessant ist, dass diese genannten Entzündungsmarker zum Zeitpunkt des Versuchsstarts ebenfalls sehr hohe Kopienzahlen aufwiesen, die in fast allen Fällen sogar deutlich höher waren als die maximale mRNA Menge bei SBM100 nach 8 Wochen. Bei allen diesen Genen wurde ein deutlicher Rückgang bis auf eine nur noch sehr geringe Anzahl an Kopien/ μg RNA zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung festgestellt. Cortisol wirkt in höheren Dosen entzündungshemmend und immunsuppressiv^{37,106,116}. Dies könnte erklären warum erst nach 8 Wochen die mRNA Expression dieser Entzündungsmarker wieder angestiegen ist, obwohl erste entzündliche Darmveränderungen schon bei einzelnen SBM100 Tieren nach 4 Wochen histologisch festgestellt wurden. IL1 β , IL4, IL8, IL10, IL22 u. a. wichtige an Entzündungsreaktionen beteiligte Zytokine konnten nicht nachgewiesen werden oder zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Fütterungsgruppen.

Die Fische wurden aus dem über 600 km entfernten Reurieth, Deutschland angeliefert. Die Startbeprobung erfolgte 2 Wochen nach Anlieferung. In dieser Adaptationsphase zeigten die Forellen keinerlei klinische Auffälligkeiten. Prophylaktisch wurden sie gegen Keime mit Peressigsäure behandelt. Histologisch konnte eine entzündliche Veränderung von Haut, Leber, Milz und Darm ausgeschlossen werden. Dass alle Gruppen vier Wochen später nahezu keine mRNA Expression dieser Gene mehr zeigten, könnte zum einen mit der Erholung vom möglichen chronischen Stressfaktoren im Aufzuchtbetrieb oder Transportstress, zum anderen mit den erhöhten Cortisolwerten in Verbindung stehen. Cortisol ist ein Stresshormon, das katabole (= abbauende) Stoffwechselfvorgänge aktiviert und so dem Körper energiereiche Verbindungen zur Verfügung stellt. Seine dämpfende

Wirkung auf das Immunsystem wird in der Medizin häufig genutzt, um überschießende Reaktionen zu unterdrücken und Entzündungen zu hemmen^{37,88}.

Das macht die hier nachgewiesenen Marker (UCP, SAA, MPO und NOS2) zum Nachweis von chronischem Stress interessant. UCP hierbei ganz besonders.

In Zusammenhang mit diesen Entzündungen ist davon auszugehen, dass die Akute-Phase-Reaktion aktiviert wurde, die eine unspezifische Immunantwort des Körpers darstellt. Es handelt sich dabei um eine akute Entzündungsreaktion auf Gewebeschädigungen, die dem Schutz vor einer Gewebeerstörung, beziehungsweise der Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der Homöostase dient^{117,118}. Mit einem auffälligen Unterschied in der mRNA Expression zwischen den Fütterungsgruppen stellte sich nur SAA da. Das Serum Amyloid A wurde nach 8 Wochen – wie auch die Entzündungszellmarker – in der SBM100 Gruppe deutlich erhöht exprimiert ($p = 0,079$).

Auch De Santis et al.¹¹⁹ untersuchten molekularbiologisch das nutrigenomische Profil von Pflanzeninduziertem Fütterungsstress, hervorgerufen durch Sojabohnenmehl bei Lachsen in Leber und Darmgewebe. Derart umfangreiche molekularbiologische Untersuchungen wie hier im Blut wurden jedoch bisher – unseres Wissens nach – noch nicht durchgeführt. Gerade die Blutuntersuchung stellt aber eine gute minimal invasive Methode dar. Vergleicht man Untersuchungen zur Ausschüttung verschiedener Botenstoffe bei einer SBM-induzierten Enteritis wird schnell deutlich, dass in den Organen andere Botenstoffe vermehrt ausgeschüttet werden, als im Blut. Bei der Untersuchung der Expressionsprofile in Geweben von insgesamt 16 Genen bei Lachsen mit einer SBMIE wurden pro-inflammatorische Zytokine IL1 β , IFN α und IFN γ , der T-Zell Rezeptor γ (TCR γ), TGF β und andere in dieser Studie nicht untersuchte Gene signifikant hochreguliert¹²⁰. In einer anderen Studie, bei der ebenfalls Lachse mit einer SBMIE untersucht wurden fand sich an Tag 1, 3 und 7 eine signifikante Herunterregulierung von TGF β . Keine Veränderung zeigte sich bei IL1 β ¹²¹ im Darmepithel. Keiner der Botenstoffe wies in dieser Studie signifikante Veränderungen auf. Jedoch zeigten sich signifikante Veränderungen bei IL1 β , TNF α und TGF β im Haltungsveruch (vgl. Kapitel 5.3, Seite 71).

Rombout und Mitarbeiter stellten die Transformation und Migration von eosinophilen Granulozyten bei Karpfen fest, die während eines durch Soja induzierten Entzündungsprozesses Lysozym in ihrem Granulat tragen¹²². Histologisch waren eosinophile Granulozyten nach 4 Wochen vermehrt im Differentialblutbild nachweisbar (vgl. Kapitel 5.1.2, Seite 66). Die prozentuale Menge war bei SBM33 zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung besonders hoch. Dies erklärt die mRNA Expression von LYG1 und LYG2 welche im Fütterungsversuch signifikante Unterschiede aufwiesen. Lysozym G1 ist wie LYG2 Teil des angeborenen Immunsystems^{123–125}. Es handelt sich hier um zwei Isoformen. Während LYG2 in der SBM33-Gruppe nach 4 Wochen signifikant erhöht ($p = 0,040$) exprimiert wurde, ist LYG1 erst nach 8 Wochen deutlich erhöht ($p = 0,073$). Scheinbar werden durch eher geringe Mengen SBM eosinophile Granulozyten getriggert. Uran et al. (2008) untersuchten darüber hinaus die Expression von entzündlichen und anti-inflammatorischen Zytokinen in isolierten intraepithelialen Lymphozyten bei Karpfen mit einer SBMIE und fanden eine Hochregulierung von IL1 β und TNF α 1, während das entzündungshemmende IL10 nach einer ersten Hochregulierung in Woche 1 wieder herunterreguliert wurde. TGF β zeigte ab Woche 3 eine vermehrte Expression¹²². LYG wurde nicht untersucht und die Unterschiede in der Genexpression sind wie oben beschrieben zu erklären. LYG kann als Granulozytenmarker klassifiziert werden. Die Beteiligung von Granulozyten ist durchaus Stress abhängig, jedoch auch von verschiedenen anderen Faktoren beteiligt, so dass LYG nicht als valider Stressmarker erscheint.

Hitze-Stress-Gene wurden im Versuch gar nicht nachgewiesen. Wie ihr Name schon sagt treten sie auf, wenn Zellen unter Temperaturstress leiden^{126–129}. Doch HSP70 und HSP90 werden auch immer wieder im Zusammenhang mit anderen Stressarten wie Stress durch organische Belastungen und anderes als Stressmarker herangezogen. Sie scheinen jedoch

eher für Hitzestress spezifisch zu sein und kommen daher nur für diese Stressart als Markermoleküle in Frage.

Zusammenfassend, es konnte gezeigt werden, dass molekulare Stressmarker spezifisch für unterschiedliche Stressarten sein müssen und dass es Unterschiede zwischen Haltungs-, Fütterungs- und bspw. Hitzestress gibt. Außerdem hat sich als wichtiges Ergebnis herausgestellt, dass diese Stressmarker immer in Relation zu anderen Parametern wie bspw. dem Gewicht des Tieres betrachtet werden müssen.

5.2 Einfluss von chronischem Stress auf Performance

Bereits eine partielle Substitution von 33 % Fischmehl durch SBM im Futtermittel führte zu einer Verschlechterung der Futtermittelverwertung, Verringerung der Wachstumsleistung. Während der negative Effekt bei den Substitutionsgruppen SBM33 (FQ = 3,41; SWR = 0,87 %/ d) und SBM66 (FQ = 3,15; SWR = 0,86 %/ d) nahezu gleich ist, konnte eine deutliche Verschlechterung der eben genannten Parameter bei einem Totalaustausch von Fischmehl durch SBM (SBM100: FQ = 5,97; SWR = 0,44 %/ d) verzeichnet werden. Bereits in vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine partielle Substitution von Fischmehl durch Sojabohnenmehl bis hin zum Totalaustausch zu schlechteren Wachstumsergebnissen führt^{47,130,131}. Mögliche Ursachen dafür wurden in einem geringen Nährstoffangebot und in hohen Anteilen an antinutritiven Inhaltsstoffen erkannt⁴⁷. Vor allem die hohen Anteile an ANF verringerten die Nährstoffverfügbarkeit, was folglich zu schlechteren Wachstumsergebnissen führte^{45,132}. Aber auch die festgestellten Durchfälle der Gruppen SBM33, SBM66 und SBM100 können einen negativen Effekt auf die Wachstumsrate der Fische genommen haben^{47,133}. Darüber hinaus wäre ein negativer Einfluss auf die individuellen Wachstumsraten durch die nachgewiesenen Cortisolgehalte denkbar. Das Glucocorticoid Cortisol kann Einfluss auf die Verdauung und die Futtermittelverwertung der Regenbogenforellen nehmen¹³⁴. Die stressinduzierten Catecholamine und Cortisolgehalte können die Biosynthese von wachstumsfördernden Hormonen wie dem Wachstumshormon (GH), Insulin, gonaden Steroiden und Schilddrüsenhormonen hemmen^{135,136}. Verglichen mit Literaturdaten ist die Futtermittelverwertung und das Wachstum der Regenbogenforellen im gegenwärtigen Versuch mit einem FQ von $2,38 \pm 0,25$ (CD) bis $5,97 \pm 2,30$ (SBM100) und einer SWR von $1,00 \pm 0,12$ %/ d (CD) bis $0,44 \pm 0,21$ %/ d (SBM100) als gering anzusehen. In einer ähnlichen Studie wiesen Regenbogenforellen nach zwölfwöchiger Fütterung eines sojahaltigen Futtermittels (FM/ SM = 63/ 37) einen FQ von 1,65 bzw. eine SWR von 1,66 %/ d auf¹³⁷. Der FQ der Forellen im Praxisversuch lag mit zwischen 0,77 („Sta in“) und 0,95 („Wie ex“) sehr niedrig, das heißt, dass das Futter sehr gut verstoffwechselt wurde. Im Vergleich wiesen die intensiv gehaltenen Starnberger-Forellen mit einem FQ von 0,77 die beste Futtermittelverstoffwechslung auf, gefolgt von „Sta ex“ mit 0,84 und „Wie in“. Am verhältnismäßig schlechtesten wurde das Futter von den extensiv gehaltenen Wielenbacher-Forellen verstoffwechselt, was möglicherweise mit der wahrscheinlichen Infektionen zusammen hängt (vgl. dazu Kapitel 5.2, Seite 70)

Im Hinblick auf die Futteraufnahme konnte gezeigt werden, dass Regenbogenforellen, welche das Futter mit 100 % igem Fischmehlaustausch (DFI = $02,43 \pm 0,13$ %/ d) erhielten, signifikant niedrigere tägliche Futteraufnahmen (DFI) gegenüber der Gruppe CD (DFI = $2,32 \pm 0,21$ %/ d) besaßen. Beide Gruppen (CD, SBM100) wiesen zudem tendenziell niedrigere Futteraufnahmen als die Gruppen SBM33 ($2,7 \pm 0,13$ %/ d) und SBM66 ($2,69 \pm 0,07$ %/ d) auf. Hierbei wäre vorstellbar, dass die Gruppen SBM33 und SBM66, verglichen mit der Kontrollgruppe CD, mehr Futter aufnehmen mussten, um den gleichen Grundnährstoffgehalt zu erhalten. Dieser könnte bei den sojahaltigen Gruppen durch die unzugänglichen Nährstoffe und die ANF reduziert sein. Eine geschmackliche Beeinträchtigung des Futters bei SBM100, durch die bitteren Sojainhaltstoffe^{138,139} kann, verglichen mit anderen Studien, eher ausgeschlossen werden. Eine gute Futterakzeptanz von Soja wurde auch aus anderen Studien bei Regenbogenforellen beschrieben^{47,140}.

Im Hinblick auf die Wachstums- und Leistungsparameter K (0,88 - 0,95), HSI (1,21 - 1,37), SSI (0,12 - 0,19) und Hkt (22 - 33 %) konnte kein signifikanter Einfluss durch den SBM-Einsatz festgestellt werden. In allen Versuchsgruppen befanden sich die Parameter HSI, SSI und Hkt im physiologischen Bereich von Blutparametern gut ernährter Regenbogenforellen^{96,97,141}. Lediglich der ermittelte K-Faktor wies im Vergleich zur Literatur (K = 1,0 - 1,2) geringfügig niedrigere Werte auf, was auf eine im Durchschnitt schlechtere körperliche Entwicklung der untersuchten Fische hindeutet¹⁴². Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die inhomogene Gewichtsverteilung der Forellen in den Becken. Im Praxisversuch waren die Starnberger- als auch die Wielenbacher Forellen dagegen sehr gut genährt und zeigten einen K von 1,25 bis 1,36. Bei den Wielenbacher-Forellen wiesen die intensiv gehaltenen Forellen zwar mit $253,0 \pm 38,7$ g ein höheres mittleres Endgewicht auf als die „Wie ex“ ($216,6 \pm 39,7$ g), jedoch war K mit 1,36 höher als bei „Wie in“. Bei den Starnberger Forellen fanden sich diese Unterschiede nicht. Die bei Versuchsende etwas leichteren „Sta ex“ hatten auch den niedrigeren K.

5.3 Praxisversuch mit Forellen aus Starnberg und Wielenbach

Es stellte sich heraus, dass sowohl die Starnberger- als auch die Wielenbacher-Forellen einen insgesamt geringen Stresslevel aufwiesen, was den Einfluss der Haltungsdichten anging. Generell ist zu beachten, dass sich ein Praxisversuch nie auf nur eine spezifische Stressart beziehen kann, da die Forellen verschiedenen Einflüssen (Temperatur- und Sauerstoffschwankungen, Eintrag von Infektionserregern o. ä.) ausgesetzt sein können.

Im Praxisversuch wurden nur die mRNA der Gene untersucht, die aus nach den Ergebnissen des Fütterungsversuch interessant erschienen und die oftmals in Zusammenhang mit Stressuntersuchungen in der Literatur beschriebenen Zytokine IL1 β , IL4, TGF β und TNF α . Während diese bei dem Fütterungsversuch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten, waren beim Haltungsveruch Veränderungen in der mRNA Expression festzustellen, wie sie auch im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen zu Stress beschrieben werden (vgl. dazu 5.1.3, Seite 67). Des Weiteren wurden auch hier die Entzündungsmarker MPO, UCP, SAA als Teil der Akuten-Phase-Reaktion, NCCRP und NOS2 untersucht. Von den übergeordneten Signaltransduktionswegen wurden die MAP-3-Kinase als Teil des MAP-Kinase Signalweges, STAT1 und USP4 ausgewertet. Während Gene dieser Gruppe im Fütterungsversuch nicht verändert waren, fanden sich hier auch signifikante Veränderungen beim PRF, einem Gen das der Komplement- und Koagulations-Kaskade zugeordnet werden kann und der Virusmarker MX1. Es wurden ebenfalls zur Normalisierung die Haushaltsgenen EEF1, ACTB und RPS5 verwendet und auch für diesen Versuch als stabil getestet.

Die meisten Gene wurden in geringen Kopienzahlen/ μ g RNA exprimiert und die Expressionsmenge der Startbeprobung veränderte sich nur bei einzelnen. Hier fällt sogleich ins Auge, dass sich die „Wie ex“ bei allen Genen anders verhalten. Die Ursache ist sehr wahrscheinlich eine Virusinfektion. So ist MX1 zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung bei „Wie ex“ signifikant erhöht ($p = 0,054$). MX1, das Myxovirus 1 Gen ist eine Interferon-induzierte GTPase mit antiviraler Wirkung gegen zahlreiche RNA und manche DNA Viren. Das nukleare Maus MX1 hemmt Influenza-Viren, das Dhori-Virus und das Thogoto-Virus. Das menschliche MXA hat auch eine antivirale Wirkung gegen Masern und Bunyaviren, Phleboviren und Hantaviren^{143–145}. MX1 ist auch bei Fischen beschrieben^{146,147}. Die erhöhte Expression korrespondiert mit den deutlich erhöhten Mortalitäten bei „Wie ex“ zwischen der 3. und 5. Versuchswoche. Auch wenn kaum Todesfälle bei den Starnberger Forellen aufgetreten sind in diesem Zeitraum, so scheint auch hier eine „Belastung“ mit Viren vorgelegen zu haben, da sich auch sowohl bei den „Sta ex“, als auch den „Sta in“ bei MX1 auch signifikant erhöhte mRNA Expressionen nach 7 Wochen finden ($p = 0,035$ und $0,007$). Und vermutlich auch die „Wie in“ waren betroffen. Dies ist nicht verwunderlich, da alle Teiche

durch dasselbe Quellwasser versorgt werden. Es zeigt aber deutlich, dass die „Wie ex“ bezüglich einer derartigen Infektion am anfälligsten waren.

Das Expressionsverhalten von verschiedenen Genen kann auf diese Art Virusinfektion, die auf Grund von fehlenden weiterführenden Untersuchungen nicht näher eingegrenzt werden kann, zurückgeführt werden. Die Untersuchungen sind dabei aber nicht mehr allein auf die Haltungsdichten zu beziehen. Es fällt auf, dass die Kopienzahlen von MX1 pro μg RNA bei den extensiv gehaltenen Forellen deutlich höher sind als bei den intensiv gehaltenen. Dies könnte für ein insgesamt erhöhtes Stressaufkommen bei sehr geringen Haltungsdichten sprechen, welches wiederum zu einer Schwächung des Immunsystems geführt haben kann. Bei einem vorausgehenden Versuch nur mit Starnberger-Forellen fanden sich darauf Hinweise (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die mRNA fast aller untersuchten Gene bei „Wie ex“ nach 7 Wochen ist in Beziehung zu setzen zu der MX1 mRNA Expression. So sind die Zytokine, welche bei einer Infektion als erstes aktiviert werden IL4, TNF α 2, TGF β , IL1 β , sowie die Entzündungsmarker MPO, UCP, NCCRP1 und NOS2 und der Granulozytenmarker LYG1 bei „Wie ex“ nach 7 Wochen in der Regel signifikant erhöht und nach 12 Wochen signifikant erniedrigt. Die massive Herunterregulierung der mRNA nach 12 Wochen ist auffällig und kann eventuell mit einer Art „Erschöpfungssyndrom“ erklärt werden, obwohl der Höhepunkt der Mortalitäten zu dem Zeitpunkt schon 7 Wochen zurück liegt, was sehr lang zu bewerten ist. Dasselbe „Verhalten“ liegt bei den übergeordneten Signaltransduktionswegen und den hierfür stellvertretend untersuchten Genen STAT1, MAP3K und USP4 vor. Sehr wahrscheinlich sind schwere Entzündungserscheinungen verantwortlich für die Mortalitäten der extensiv gehaltenen Wielenbacher-Forellen und auch das Komplementsystem (PRF) und die Akute-Phase-Reaktion (SAA) wurden aktiviert. Bei SAA ist erst nach 12 Wochen die mRNA Expression signifikant hochreguliert und weist bei „Wie in“ zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung sehr hohe Kopienzahlen/ μg RNA auf. Die Akute-Phase-Reaktion wird bei Ratten durch Zytokine wie IL1, IL6, Interferon γ , TNF α oder TGF β ausgelöst. Die Zytokine gelangen mit der Blutzirkulation in die Leber. Dort regen sie zusammen mit Cortisol die Leberzellen zur Produktion von etwa 30 verschiedenen Akute-Phase-Proteinen an. Akute-Phase-Proteine fördern die Wundheilungsprozesse und reduzieren das Ausmaß der Gewebeschädigung. Sie sind daher wichtige diagnostische Marker ¹⁴⁸. Bei Fischen sind vergleichbare Reaktionen beschrieben ¹¹⁸, in dieser Studie ist die mRNA Expression von PRF bei „Sta ex“ im Vergleich zu „Sta in“ nach 7 Wochen tendenziell erhöht und die SAA Expression weist nach 7 Wochen zwischen den beiden sogar ein tendenziell signifikante Erhöhung bei „Sta in“ auf, obwohl bei der TNF α -, TGF β - oder IL1 β -mRNA Expression keine Unterschiede zu finden sind.

Nach 12 Wochen sind IL4, TGF β , PRF, SAA, NCCRP, LYG1 und NOS2 bei den ökologisch intensiv gehaltenen Starnberger-Forellen signifikant erhöht. Die Ursache hierfür kann nicht genau bestimmt werden. Denkbar ist Stress, der durch Sauerstoffmangel ausgelöst wurde. So fand sich bei „Sta in“ nur ein mittlerer Sauerstoffgehalt von $69,59 \pm 8,91$ % während des Versuchs.

Das macht den Marker UCP als kurzfristigen, spezifischen Marker interessant, der während einer Virusinfektion deutlich hoch reguliert wird, danach jedoch keine wesentlichen Veränderungen zwischen den Haltungsguppen zeigt, während SAA eher einen guten Langzeitmarker darstellt. An dieser Stelle können nur Vermutungen angestellt werden, tatsächliche Aussagen können erst nach durchgeführten Clusteranalysen, wie sie für die geplanten Veröffentlichungen angefertigt werden, getroffen werden.

Bei den Fischen aus der extensiven Haltungsguppe war bei den „Starnbergern“ jedoch ein wenig höherer Stress über die molekularen Marker nachweisbar, als bei den extensiv produzierten „Wielenbachern“.

5.4 Beantwortung der Untersuchungsschwerpunkte

(1) Was ist im Allgemeinen bei Stressuntersuchungen bei Forellen zu beachten?

Es braucht „überordnete“ Marker, die anzeigen, ob Forellen oder andere Fischarten Stress haben oder hatten. Die untersuchten Marker, welche in der Stresskaskade weiter unten stehen sind oftmals nicht spezifisch genug. Es ist zu unterscheiden, ob mittels eines Detektionssystems genau auf einen spezifischen Stresseinfluss bspw. Fütterungsstress, Handling-Stress oder Stress durch vom Optimum abweichende Wasserwerte untersucht werden soll oder ob nur insgesamt festgestellt werden soll, ob die Forellen Stress ausgesetzt sind. Aus dem Tierschutz-Aspekt gesehen, ist es insgesamt erstmal nur wichtig beurteilen zu können, ob sich die Fische „wohlfühlen“ oder nicht, aber gerade in Bezug auf die Ursachenbekämpfung ist es essentiell verschiedene Stressereignisse voneinander abgrenzen zu können.

Während beim Vorversuch, Fütterungsversuch viele Gene, die der großen Gruppe der Entzündungsreaktionen zugeordnet werden können, signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen SBM33 und SBM100 aufwiesen, waren es beim Haltungsveruch eher Gene, die auf eine allgemeine Schwächung des Immunsystems hindeuten mit Ausnahme der extensiv gehaltenen Wielenbacher-Forellen, die scheinbar an einer Virusinfektion erkrankten. Eine hohe Mortalität wurde verzeichnet.

Untersuchungen auf chronische Stressparameter können immer nur eine retrospektive Beurteilung der Haltungssituation in Bezug auf Stress bieten, was für die Praxis jedoch als völlig ausreichend erscheint. Für den Verbraucher und zur Beurteilung aus Tierschutzsicht, können solche chronischen Parameter einen Anhaltspunkt über den Umgang und die Haltungsbedingungen der Fische im Produktionsprozess bieten. Es ist jedoch zu beachten, dass einmalige Krankheitsausbrüche mit einer vermehrten Ausschüttung von Stress-abhängigen Molekülen ins Blut nicht zwangsläufig mit einem schlechten „Welfare“-Status des Betriebes zusammenhängen.

Wie die Literatur zeigt, können Stressmarker, die für die Forelle etabliert wurden nicht zwangsläufig auf andere Fischarten übertragen werden. Verhalten sich Lachse und Forellen als Salmoniden immunologisch ähnlich, so gibt es deutliche Unterschiede zu Cypriniden oder anderen nicht so nahe verwandten Fischarten.

(2) Welche der untersuchten chronischen Stressparameter eignen sich zur Definition und zum Monitoring des „welfare“-Status bei Forellen?

Bei der Messung von **Cortisol** im Blutplasma liegen große individuelle Unterschiede zwischen den Fischen vor. Da die Cortisolausschüttung von zahlreichen anderen Faktoren wie Licht und Tagesrythmen abhängig ist und bei chronisch bestehendem Stress in Folge des Adaptationssyndroms nicht mehr nachweisbar ist, wird die Messung von Cortisol als chronischer Stressmarker nicht und als akuter Stressmarker nur in Verbindung mit der Messung anderer Parameter empfohlen. Zurzeit ist die Messung noch mäßig kostenintensiv und aufwendig. Sie macht für die Praxis nur Sinn, wenn ein Schnelltestsystem entwickelt würde, welches detaillierte Fischart-, Gewicht-, Tageslichtlängen- und Tageszeiten-spezifische Auswertungs-/ Beurteilungstabellen zur Verfügung stellen würde.

Die **Futteraufnahme und Wachstumsleistung** der Fische ist nach wie vor als Stressparameter zu empfehlen, wenn auch mit einem höheren Aufwand durch notwendige regelmäßige Zwischenwägungen während des Produktionsprozesses, die ihrerseits wieder zu Handlingstress führen können, verbunden. Hier handelt es sich um keinen spezifischen Stressparameter. Ein schlechtes Wachstum gibt lediglich Hinweise auf das allgemeine Wohlbefinden der Fische. Es gibt keinen Hinweis darauf, warum die Fische gestresst sind, so dass die Ursachenbekämpfung erschwert wird. Eine Beurteilung einzelner Fische ist nicht möglich. Sie ist im Produktionsprozess von unter geordneter Bedeutung, kann für ein diffiziles „welfare“-Monitoring der einzelnen Fische jedoch essentiell sein. Trotz aller

Nachteile bleibt die Performanceleistung vorerst ein kostengünstiger praxisrelevanter „welfare“-Indikator.

Der **Hepatosomische- und Splenosomatische Index**, die in manchen Studien auch als Stressparameter herangezogen werden können für Fütterungsstress nicht empfohlen werden. Es fanden sich im Versuch keine signifikanten Unterschiede zwischen den SBM-Austauschgruppen und auch histologisch zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Leber oder Milz. Die Aussagekraft des reinen Milz- und Lebergewichtes im Verhältnis zum Gesamtgewicht erscheint ohne histologische Untersuchung auf Entzündungen, folliculäre Hyperplasien, Verfettungen etc. darüber hinaus fraglich und damit nicht praxisrelevant.

Das **Differentialblutbild** als Stressparameter heranzuziehen, ist mit etwas Übung leicht in der Praxis umsetzbar. Jedoch erscheint der Parameter zur alleinigen Verwendung nicht valide genug. Zwar konnten gesunkenen Anteile an Lymphozyten, bei gleichzeitig gestiegenen Granulozyten- und Monozytenanteilen mit Stress korreliert werden, jedoch bleibt der Parameter ebenfalls unspezifisch für die Stressart und damit für die Ursachenbekämpfung in der Praxis von untergeordneter Bedeutung.

Es konnte gezeigt werden, dass **molekulare Stressmarker** spezifisch für unterschiedliche Stressarten sein müssen und dass es Unterschiede zwischen Haltungs-, Fütterungs- und bspw. Hitzestress gibt. Außerdem hat sich als wichtiges Ergebnis herausgestellt, dass diese Stressmarker immer in Relation zu anderen Parametern wie bspw. dem Gewicht des Tieres oder anderen Haltungsgruppen betrachtet werden müssen. Molekulare Stressmarker bieten viele Möglichkeiten zur detaillierten Beschreibung der Stressphysiologie in der Forelle, sie reagieren teils sehr schnell und teils verzögert und sind durch letzteres prädisponiert als chronischer Stressmarker herangezogen zu werden.

(3) Können „überordnete“ von in der Stresskaskade „nachgestellten“ Stressmarkern unterschieden werden?

Ja, aber die Zuordnung zu „übergeordnet“ oder „nachgestellt“ bedarf weiterer Klärung, welche in Form von Clusteranalysen in den geplanten Veröffentlichungen dargestellt werden wird. Gute Kandidaten sind z. B. USP4, STAT1 und MAP3K als „übergeordnete“ Kandidaten, da diese deutliche Reaktionen zeigen. Beim Praxisversuch wurde das ganz deutlich in der „Erschöpfung“ von STAT1, MAP3K und USP4 nach 12 Wochen, nachdem die mRNA Expression zum Zeitpunkt der vermeintlichen Virusinfektion massiv hochreguliert worden ist.

Typische „nachgestellte“ potentielle Stressmarker sind z. B. IL4, IL1 β , TNF α , TGF β aber auch Entzündungsmarker wie MPO oder NOS2 und LYG, während die Aktivatoren der Akuten-Phase-Reaktion und der Komplementkaskade (SAA und PRF) ans „Ende“ einsortiert werden können, da sie eine Folge auf eine vorliegende Entzündung als zelluläre Reaktion auf Stress, darstellen.

(4) Wie ist das Verhältnis der Stressparameter am Anfang der Stresskette zu den Parametern am Ende der Stresskette?

Um diese Frage zu beantworten, müssen statistische Clusteranalysen vorgenommen werden, die sehr aufwendig sind und erst in den geplanten Veröffentlichungen ausgewertet werden können. Schon jetzt wird deutlich, dass übergeordnete Signaltransduktionswege, „nachgeschaltete“ Botenstoffe beeinflusst haben.

(5) Welche Korrelationen bestehen zwischen den untersuchten Stressparametern?

Bei einigen der „klassischen“ Parameter besteht eine – so bisher noch nicht beschriebene – Korrelation mit dem Gewicht. Daher ist es sehr wichtig das Gewicht bei der Untersuchung der Stressparameter zu berücksichtigen. Die histologischen Veränderungen in Darm, Leber und Milz konnten mit Stress (z. B. ein erhöhter Anteil an Melanomakrophagen in Leber und

Milz) und mit durch die Inhaltsstoffe des SBM verursachte Entzündungsreaktionen (diffuse, eosinophile Enteritis) korreliert werden, waren aber nicht signifikant zwischen den Gruppen. Darüber hinaus ist stark anzunehmen, dass die Ausschüttung verschiedener Gene durch Cortisol beeinflusst wird, dessen Konzentration nach 4 Wochen im Fütterungsversuch eine deutliche Erhöhung zeigte und nach 8 Wochen wieder abgefallen ist. Zum Zeitpunkt der Zwischenbeprobung, bei erhöhten Cortisolwerten waren die Entzündungsmarker herunterreguliert, was durch die entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkung von Cortisol erklärt werden kann.

(6) Sind die etablierten chronischen Stressmarker valide und praxistauglich?

Die etablierten Stressmarker bieten die entscheidende Grundlage, um minimal invasive, sehr praxistaugliche Detektionssysteme zu entwickeln, dessen Erhebung dann auch im Sinne der Aquakultur 4.0 digital denkbar ist. Die Messung allein von Cortisol – das im Übrigen auch nicht „einfach“ im Praxisbetrieb messbar ist – ist nicht mehr zeitgemäß.

Momentan bleibt die Erhebung der molekularen Stressmarker aufwendig und müsste an ein externes Labor abgegeben werden. Dies ist zwar möglich, jedoch mit Kosten verbunden. Die Erhebung vor Ort im Praxisbetrieb ist dato nicht möglich. Dennoch ist anzustreben, die bis dato nutzbaren, einfachen und praxistauglichen „Welfare“-Indikatoren wie Mortalität, Aussehen, Verhalten, Futteraufnahme und Gewichtszunahme, welche sehr subjektiv bewertet werden und damit wenig standardisierbar sind mit der Etablierung neuer Methoden zu untermauern.

Die etablierten Stressmarker reagieren sehr sensibel, nach den Versuchsergebnissen auf Fütterungsstress und andere Stressoren, welche Entzündungsreaktionen im Körper hervorrufen. Möglicherweise sind sie auch nutzbar bei Transportstress. Hierfür gab es jedoch nur erste Anhaltspunkte und die Ergebnisse müssten weiter validiert werden.

(7) Welche Vor-/Nachteile bieten sie in Bezug auf „konventionelle Marker“ wie Hämatokrit oder das Differentialblutbild?

Bessere Spezifität und nach Etablierung eines Detektionssystems sehr einfache Anwendung.

(8) Wie steht der akute Stressmarker Cortisol zu den neu etablierten „Markern“?

Siehe dazu die Erläuterungen unter Punkt (2).

(9) Gibt es Unterschiede in der Stressresistenz und Anpassungsfähigkeit von Starnberger- und Wielenbacher-Forellen, die unter ökologisch intensiven und extensiven Haltungsdichten in Bezug auf die vorgeschriebenen ökologischen Haltungsbedingungen gehalten wurden?

- **Liegen bei der unterschiedlichen Anpassungsfähigkeit der Starnberger- und Wielenbacher-Forellen Unterschiede in der Stressverarbeitung vor?**
 - **Gibt es tatsächlich Unterschiede in der Stressresistenz zwischen beiden Herkünften?**
 - **Oder handelt es sich um eine Adaptation anderer, z. B. vermutlich genetischer, Art?**
 - **Welche der beiden Herkünfte ist stressresistenter?**

Die Starnberger-Forellen scheinen stressresistenter zu sein. Möglicherweise hängt dies jedoch mit der Adaptation an die Wasser- und Haltungsbedingungen in der Versuchseinrichtung in Starnberg zusammen. Die unter extensiven Bedingungen aufgewachsenen Wielenbacher-Forellen, wachsen in der ökologisch extensiven Haltung besser, als die Starnberger-Forellen, die intensiv aufgewachsen sind. Insgesamt bestehen zwischen den intensiv produzierten Starnberger-Forellen und den extensiv produzierten Wielenbacher-Forellen jedoch nur geringe Unterschiede. Dennoch scheinen sich die extensiv produzierten „Wielenbacher“ weniger gut an die ökologisch intensiven

Haltungsintensität adaptieren zu können und insgesamt eine etwas schlechtere Adaptation an ein Stressevent aufzuweisen.

(10) Welche Empfehlungen können für ein tiergerechtes Verfahren in der Forellenproduktion gegeben werden?

Am besten sollten die Besatzfische in der Einrichtung mit den Wasserqualitäten ausgebrütet und aufgezogen werden, in der sie später gemästet werden sollen. Hier ist auch schon frühzeitig zu beachten, in welcher Besatzdichte die Fische später gehalten werden sollen. Zu geringe Besatzdichten können Stress erzeugen, genau wie zu hohe. Welche Besatzdichte für den Betrieb die richtige ist, ist immer auch vorerst von der Fischart, dem Management und ganz entscheidend der Wasserqualität abhängig. Da die eigene Aufzucht nicht für jeden Betrieb möglich ist, sollte beim Kauf von Besatzmaterial darauf geachtet werden, dass diese möglichst unter vergleichbaren intensiven oder extensiven Bedingungen gezüchtet wurde, wie später gemästet werden soll. Für die ökologische Fischproduktion gilt, dass Besatzmaterial aus Betrieben mit eher extensiver Besatzdichte zugekauft werden sollte, wenn nicht direkt ökologisch produziertes Besatzmaterial zur Verfügung steht, da selbst die ökologisch intensiven Besatzdichten mit maximal 25 kg/ m³ im Vergleich zur konventionellen Aquakultur mit teilweise sehr viel größeren Fischmengen als niedrig anzusehen sind.

Wann die Anpassung an Stress erfolgt, ist bisher noch nicht geklärt, es ist jedoch anzunehmen, dass diese bereits in einem frühen Entwicklungsstadium geschieht. Neuste Forschungshypothesen gehen davon aus, dass neuronale Wege, die Resilienz fördern, zum Zeitpunkt des Stresses eingeleitet werden und dass sie eine Glukokortikoidsignalisierung neuronal beeinflussen¹⁴⁹. Forschungsergebnisse zur Neurobiologie in Bezug auf Resilienzinduktion liegen für Fische noch nicht vor.

Futteraufnahme und Wachstumsrate sind weiterhin gute erste Anhaltspunkte, die zur Beurteilung des Gesundheitsstatus der Forellen immer mit herangezogen werden können.

6 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

Mit dieser Studie wurde erstmal ein derartig umfassendes Screening zu Fütterungsstress und anderem mit Entzündungen korreliertem Stress erhoben. Verschiedene Gene konnten hier schon sicher abgegrenzt werden, andere sind noch genauer zu klassifizieren. Die Ergebnisse sind schon jetzt praxisnahe, da auf diese Weise Stress bei Fischen gemessen werden kann. Jedoch muss dazu bisher noch eine Blutprobe eingeschickt werden. Damit sind sie dato noch nicht direkt, einfach in die Praxis übertragbar, weil die molekularen Marker momentan noch nicht einfach und selbständig von jedem Praktiker selbst gemessen werden können. Sie stellen jedoch zusätzlich die entscheidende Grundlage dar, um minimal invasive, sehr praxistaugliche Detektionssysteme zu entwickeln, dessen Erhebung dann auch im Sinne der Aquakultur 4.0 digital denkbar ist. Damit sind die Ergebnisse praxisnahe, bedürfen jedoch noch weiterer Bearbeitung. So wird es auch notwendig sein, die Parameter später für jeden Betrieb individuell zu bewerten, da sich Referenzwerte durch die zahlreichen Unterschiede in der Produktionstechnik schwer festlegen lassen werden. Abweichungen, nach oben oder nach unten werden aber sicher ein Stressereignis anzeigen können, so dass reagiert werden kann. Wenn die Detektionsmethode wie eine Art Diabetestest entwickelt wurde, stellt sich dies auch nicht mehr als Problem dar. Stress muss nicht immer negativ sein, bei jeder Fütterung werden zu einem gewissen Grad Stressparameter ausgeschüttet, so dass es immer eine Art Grundrauschen der mRNA Expression verschiedener untersuchter Parameter geben wird, welches mit Serienmessungen in einem Betrieb umgangen werden kann.

Im Rahmen der Tierschutzdiskussion, die sich mittlerweile auch auf die Aquakultur und Fische erstreckt, ist die Möglichkeit Stress bei Forellen messen zu können auf jeden Fall auch als praxisrelevant einzuschätzen. Schon jetzt sind als praxisrelevante Ergebnisse zu

nennen, dass Stressparameter immer Stressart- und Fischartspezifisch erhoben und ausgewertet werden müssen. Für Forschungsprojekte zu Stress ist es von entscheidender Bedeutung vorher eine ausführliche Recherche zu betreiben, welcher Stressmarker geeignet ist. Denn wenn nicht der „richtige“ Marker untersucht wird, so werden schnell falsch negative Ergebnisse generiert.

Da zu Beginn der Studie im November 2014 molekulare Marker für Fische in der Literatur noch nicht immer stressartspezifisch unterschieden wurden entschieden sich die Zuwendungsempfänger, auch auf Grund der an der GMA vorliegenden Expertise im Bereich der Futtermittelforschung im Bereich Aquakultur, zur Etablierung der „Marker“ ein Fütterungsmodell mit Sojabohnenmehl zur Erzeugung von Stress zu wählen, obwohl im Praxisversuch der Schwerpunkt auf der Besatzdichte lag. Im Laufe des Projektes hat sich herausgestellt, dass es einige übergeordnete Marker gibt, die sowohl bei Fütterungsstress, einer viralen Infektion und vermutlich auch durch Transportstress beeinflusst werden. Außerdem wurde ein Modell zur Untersuchung von Stress entwickelt. Diese Ergebnisse sind in der Futtermittelforschung, bspw. zur Überprüfungen von stressmindernden oder entzündungshemmenden Futterzusatzstoffen anwendbar und ein wichtiges Nebenergebnis dieser Studie.

Ein Merkblatt zwecks Transfer der Ergebnisse in die Praxis wurde erarbeitet.

7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Die Entwicklung von adäquaten Stressmarkern und das Verständnis der Abläufe im Organismus des Fisches während der Einwirkung eines chronischen Stressors ist besonders für die Praxis bedeutsam, um Stress nicht zu unter- oder zu überschätzen. Die hier entwickelten Marker bieten einen wichtigen zusätzlichen Erkenntnisgewinn in Bezug auf das Wohlbefinden des Fisches neben den allgemeinen „welfare“-Parametern wie Tierverluste, Futteraufnahme und Gewichtszunahme, Wasserqualität, Verhalten und Schwimmweise. Während diese zuletzt genannten Parameter nur eine bedingt hinreichende Aussage zu Tierschutzaspekten zulassen, bietet die Bestimmung von molekularbiologischen Markern ein sehr viel differenzierteres Bild. Mit dem beantragten Projektvorhaben wurden damit – wie geplant – tierart- und haltungsspezifische Daten erhoben, die auch auf andere Regionen und Betriebe übertragbar sind, sowie kurz- und langfristig eine fundierte Bewertungsgrundlage für das Auftreten von Stress bei Forellen darstellen. „Animal welfare“ kann damit konkretisiert werden.

Diese grundlegende Fragestellung konnte im ersten Projektzeitraum beantwortet werden. Es ergaben sich daraus weiterführende Fragestellungen, die in der einjährigen Verlängerung bearbeitet wurden. Diese weitere Konkretisierung war notwendig, um den Ergebnistransfer in die Praxis entscheidend zu verbessern. Der Schwerpunkt lag hier auf der Untersuchung von Parametern der früheren Phasen der Stresskette. Das Ziel konnte erreicht werden, in dem signifikante, durch Fütterungsstress und eine vermeintliche Virusinfektion hervorgerufene Veränderungen in den STAT, MAP3K und NF- κ B Signaltransduktionswegen aufgezeigt werden konnten. Ein tatsächliches Verhältnis der Stressparameter am Anfang der Stresskette zu den Parametern am Ende der Stresskette konnte bisher noch nicht bestimmt werden. Auch die Beantwortung der Frage, ob bei der unterschiedlichen Anpassungsfähigkeit der Starnberger- und Wielenbacher-Forellen Unterschiede in der Stressverarbeitung vorliegen, konnte bisher nicht beantwortet werden, da eine Virusinfektion zu Veränderungen in der Genexpression bei den Forellen geführt hat. Clusteranalysen werden hierzu noch durchgeführt und die Ergebnisse in den geplanten Veröffentlichungen in 2019 dargestellt. STAT1, MAP3K und USP4 scheinen für Forellen als übergeordnete

Stressparameter fungieren zu können, die anzeigen, dass Stress überhaupt vorliegt und weitergehende Untersuchungen zu spezifischen Stressmarkern erforderlich sein könnten.

8 Zusammenfassung

Ziel war es Forellen unterschiedlicher Herkunft auf die bestmögliche Anpassungsfähigkeit und größte Stressresistenz in Bezug auf vorgeschriebene ökologische Haltungsbedingungen (ökologisch intensive Haltung mit maximal 25 kg/ m³ und extensive, maximal 6 kg/ m³ zu untersuchen und dabei neue valide, minimal invasiv messbare Stressparameter zu etablieren.

Im Verbund der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der CAU mit der Gesellschaft für Marine Aquakultur mbH (GMA) und dem Institut für Fischerei der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, sowie später dem Leibniz Institut für Nutztierbiologie, Institut Genombiologie, Abteilung Fischgenetik (FBN) wurde nach Etablierung von molekularen Stressmarkern unter Nutzung eines Fütterungsstressmodellversuchs mit Sojabohnenmehl, die Stressresistenz und -adaptation von zwei unterschiedlichen Forellenherkünften in intensiver und extensiver ökologischer Haltung untersucht.

Ein wichtiges erstes Ergebnis dieser Studie ist, dass Stressparameter immer Stressartspezifisch betrachtet werden müssen. Im Laufe des Projektes hat sich herausgestellt, dass es tatsächlich dennoch einige übergeordnete Marker gibt, die sowohl von Fütterungsstress, einer viralen Infektion und vermutlich durch Transportstress beeinflusst werden. Außerdem wurde durch den Versuch ein Modell zur Untersuchung von Stress entwickelt. Diese Ergebnisse sind in der Futtermittelforschung, bspw. zur Überprüfungen von stressmindernden oder entzündungshemmenden Futterzusatzstoffen anwendbar und ein wichtiges Nebenergebnis dieser Studie.

Insgesamt wurde mittels eines Fluidigm Biomark HD-System am FBN insgesamt die mRNA aus Blut von 88 verschiedenen Genen untersucht und teilweise mit einem Light Cycler Systems in Dummerstorf und in Büsum nachgemessen.

Neben drei Haushaltsgenen, die mittels gNorm als stabil getestet wurden, konnten die regulierten Genen den übergeordneten Signaltransduktionswegen wie der SERPIN G Superfamilie, der intrazelluläre PI3K/Aktin-, Toll-like Rezeptor-, NF-κ B-, MAP-Kinase- und JAK-STAT-Signaltransduktion oder intrazellulären Pathogenerkennungsrezeptoren zugeordnet werden. Es wurde die mRNA Expression der Blutzellen auf verschiedene pro- und anti-inflammatorische Zytokine, Chemokine, Stoffe die an der Akuten-Phase-Reaktion beteiligt, der Komplementkaskade zugeordnet werden können oder an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, sowie Hitzeschockproteine getestet. Abschließend wurden verschiedene Markergene für bestimmte Zellpopulation mit untersucht.

Die Ergebnisse des Fütterungsversuchs zeigen, dass Daten zu Cortisol, Hkt und Blutbild allein keine validen Stressmarker darstellen, da sie zum einen großen individuellen Schwankungen unterliegen und zum anderen vom Gewicht des Untersuchungstieres abhängig sein können. Futteraufnahme und Wachstumsparameter können weiterhin als praxistaugliche Methode zur ersten Einschätzung des „welfare“-Status von Forellen empfohlen werden.

Durch die zahlreichen Einflüsse die in der Praxis Stress auslösen können, war schnell klar, dass es „überordnete“ Marker braucht. Aus dem Tierschutz-Aspekt gesehen, ist es insgesamt erstmal wichtig beurteilen zu können, ob sich die Fische „wohl fühlen“ oder nicht, aber gerade in Bezug auf die Ursachenbekämpfung ist es essentiell verschiedene Stressereignisse voneinander abgrenzen zu können.

Gut erscheinen z. B. USP4, STAT1 und MAP3K als „übergeordnete“ Kandidaten. Beim Praxisversuch wurde das ganz deutlich in der „Erschöpfung“ dieser Gene nach 12 Wochen deutlich, nachdem die mRNA Expression zum Zeitpunkt der vermeintlichen Virusinfektion massiv hochreguliert worden war. Auch im Fütterungsexperiment werden sie durch Stress

herunterreguliert. Typische „nachgestellte“ potentielle Stressmarker sind z. B. IL4, IL1 β , TNF α , TGF β aber auch Entzündungsmarker wie MPO oder NOS2, während die Aktivatoren der Akuten-Phase-Reaktion und der Komplementkaskade (SAA und PRF) ans „Ende“ einsortiert werden können, da sie eine Folge auf eine vorliegende Entzündung, als zelluläre Reaktion auf Stress, darstellen. Während SAA vermutlich eher als guter Marker für ein länger zurückliegendes Stressereignis fungieren könnte, normalisiert sich UCP sehr schnell wieder und erscheint eher für die Detektion von Stress, der noch nicht so lange zurück liegt interessant zu sein. Zur detaillierten Beurteilung von Stress wird voraussichtlich eine Kombination der untersuchten Marker die besten Ergebnisse bieten. Dies wird in der noch ausstehenden Clusteranalyse evaluiert werden.

Bezüglich der Frage zur Stressresistenz verschiedener Forellenherkünfte kann die Empfehlung gegeben werden Besatzfische am besten in der Einrichtung mit den Wasserqualitäten ausgebrütet und aufzuziehen, in der sie auch später gemästet werden sollen. Hier ist auch schon frühzeitig zu beachten, in welcher Besatzdichte die Fische später gehalten werden sollen. Zu geringe Besatzdichten können Stress erzeugen, genau wie zu hohe. Welche Besatzdichte für den Betrieb die richtige ist, ist immer auch vorerst von der Fischart, dem Management und ganz entscheidend der Wasserqualität abhängig. Da die eigene Aufzucht nicht für jeden Betrieb möglich ist, sollte beim Kauf von Besatzmaterial darauf geachtet werden, dass dieses möglichst unter vergleichbaren intensiven oder extensiven Bedingungen gezüchtet wurde, wie später gemästet werden soll. Für die ökologische Fischproduktion gilt, dass Besatzmaterial aus Betrieben mit eher extensiver Besatzdichte zugekauft werden sollte, wenn nicht direkt ökologisch produziertes Besatzmaterial zur Verfügung steht, da selbst die ökologisch intensiven Besatzdichten mit maximal 25 kg/m³ im Vergleich zur konventionellen Aquakultur mit teilweise sehr viel größeren Fischmengen als eher niedrig anzusehen sind.

Die Ergebnisse stellen eine wichtige Grundlage dar, um „animal welfare“ in der Forellenhaltung besser beurteilen zu können. Sie sind ein wichtiger erster Schritt, um in der Zukunft fundierte, frühzeitige Einschätzungen zur chronischen Stressbelastung von Forellen treffen zu können, die minimal invasiv sind. Bisher beziehen sich die Parameter auf oftmals wenig standardisierbare Beobachtungen wie Verhalten, Farbveränderungen und ähnliches. Diese Ergebnisse hier stellen die Grundlage dar, um zukünftig praktische Detektionssysteme – vergleichbar mit einem Diabetestest – auch in Hinblick auf Aquakultur 4.0 entwickeln zu können.

9 Literaturverzeichnis

1. Bergleiter, S. *Organic aquaculture. Production and markets.* (2009).
2. Hiller, J. & Wichmann, T. *Betriebszweigauswertung ökologisch und konventionell wirtschaftende Aquakultur-Betriebe.* (2010).
3. Lasner, T., Hamm, U., Aas, M. & Oberle, M. *Marktanalyse für ökologische Aquakulturerzeugnisse.* (2010).
4. Broom, D. Indicators of poor welfare. *Brit Vet J* **14**, 99–104 (1986).
5. Duncan, I. J. H. Animal welfare defined in terms of feelings. *Acta Agric Scand* **27**, 29–35 (1996).
6. Gjedrem, T. & Baranski, M. in *Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction* (Springer Verlag, 2009).
7. Ings, J. S., Oakes, K. D., Vijayan, M. M. & Servos, M. R. Temporal changes in stress and tissue-specific metabolic responses to municipal wastewater effluent exposure in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **156**, 67–74 (2012).
8. Bernier, N. J. & Craig, P. M. CRF-related peptides contribute to stress response and regulation of appetite in hypoxic rainbow trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, R982–90 (2005).
9. LeBlanc, S., Middleton, S., Gilmour, K. M. & Currie, S. Chronic social stress impairs thermal tolerance in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* **214**, 1721–31 (2011).
10. Sörensen, C., Nilsson, G., Summers, C. & Överli, Ö. Social stress reduces forebrain cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Behav. Brain Res.* **227**, 311–318 (2012).
11. Ebrahimi, G. Effects of rearing tank background color on growth performance in juvenile common carp, *Cyprinus carpio* L. *Agric. J.* **6**, 213–217 (2011).
12. Barton, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* **42**, 517–25 (2002).
13. Sumpter, J. P., Dye, H. M. & Benfey, T. J. The effects of stress on plasma ACTH, alpha-MSH, and cortisol levels in salmonid fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **62**, 377–85 (1986).
14. Barton, B. A. & Iwama, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* **1**, 3–26 (1991).
15. Donaldson, E. M. in *Stress and fish* (ed. Pickering, A. D.) 11–47 (Academic Press, 1981).
16. Mazeaud, M. M., Mazeaud, F. & Donaldson, E. M. Primary and Secondary Effects of Stress in Fish: Some New Data with a General Review. *Trans. Am. Fish. Soc.* **106**, 201–212 (1977).
17. Nakano, S. Variation in agonistic encounters in a dominance hierarchy of freely interacting red-spotted masou salmon (*Oncorhynchus masou ishikawai*). *Ecol Freshw Fish* **3**, 153–158 (1994).
18. Overli, O., Harris, C. A. & Winberg, S. Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain. Behav. Evol.* **54**, 263–75 (1999).
19. Windberg, S., Nilsson, G. E. & Olsen, K. H. Changes in brain serotonergic activity during hierarchical behavior in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) are socially induced. *J Comp Physiol. A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **170**, 93–99 (1992).
20. Amorin, M. C. P. & Almada, V. C. . The outcome of male-male encounters affects subsequent sound production during courtship in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Anim. Behav.* **69**, 595–601 (2005).
21. Øverli, Ø., Windberg, S., Damsgard, B. & Jobling, M. Food intake and spontaneous swimming activity in Arctic char (*Salvelinus alpinus*): role of brain serotonergic activity and social interactions. *Can. J. Zool. Rev Can Zool* **76**, 1366–1370 (1989).
22. Windberg, S. *et al.* Feeding rank and brain serotonergic activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* **179**, 197–211 (1993).
23. Green, T. J., Smullen, R. & Barnes, A. C. Dietary soybean protein concentrate-induced intestinal disorder in marine farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* is associated with alterations in gut microbiota. *Vet. Microbiol.* **166**, 286–292 (2013).
24. Conte, F. S. Stress and the welfare of cultured fish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **86**, 205–223 (2004).
25. Madeira, C. *et al.* Thermal stress, thermal safety margins and acclimation capacity in tropical shallow waters—An experimental approach testing multiple end-points in two common fish. *Ecol. Indic.* **81**, 146–158 (2017).
26. Schreck, C. B. & Tort, L. The Concept of Stress in Fish. *Fish Physiol.* **35**, 1–34 (2016).

27. Doyon, C., Trudeau, V. & Moon, T. *Stress elevates corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein mRNA levels in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *The Journal of endocrinology* **186**, (2005).
28. Elofsson, U. O. E., Mayer, I., Damsgård, B. & Winberg, S. Intermale Competition in Sexually Mature Arctic Charr: Effects on Brain Monoamines, Endocrine Stress Responses, Sex Hormone Levels, and Behavior. *Gen. Comp. Endocrinol.* **118**, 450–460 (2000).
29. Winberg, S. & Nilsson, G. E. Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **106**, 597–614 (1993).
30. Wedemeyer, G. A. & McLeay, D. J. in *Stress and Fish* (ed. Pickering, A. D.) 247–275 (Academic Press, 1981).
31. Pickering, A., Pottinger, T. & Christie, P. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. *J. Fish Biol.* **20**, (1982).
32. Damsgard, B., Sorum, U., Ugelstad, I., Eliassen, R. & Mortensen, A. Effects of feeding regime on susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to cold water vibriosis. *Aquaculture* **239**, 37–46 (2004).
33. Mesa, M., Maule, A. & Schreck, C. Interaction of infection with *Renibacterium salmoninarum* and physical stress in juvenile chinook salmon: physiological responses, disease progression, and mortality. *Trans. Am. Fish. Soc.* **129**, 158–173 (2000).
34. Olsen, Y., Falk, K. & Reite, O. Cortisol and lactate levels in Atlantic salmon *Salmo salar* developing infectious anaemia (ISA). *Dis. Aquat. Org. Aquat Org.* **14**, 99–104 (1992).
35. Wedekind, H. Vergleich eines konventionellen mit einem „ökologischen“ Forellenfutter. *Fischer und Teichwirt* **54**, 443–444 (2003).
36. Pottinger, T. G., Pickering, A. D. & Hurley, M. A. Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **103**, 275–289 (1992).
37. Fevolden, S. & Røed, K. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress. *J. Fish Biol.* **43**, 919–930 (2005).
38. Gall, G. & Crandell, P. The rainbow trout. *Aquaculture* **100**, 1–10 (1992).
39. Lelek, A. & Buhse, G. *Fische des Rheins früher und heute*. (Springer Berlin Heidelberg, 1992).
40. Hardy, R. W. Use of Soybean Meals in Diets of Salmon and Trout. (2003). at <<http://www.soymeal.org/FactSheets/SalmonidTechReview.pdf>.>
41. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Cultured aquatic species information programme *Oncorhynchus mykiss*. (2015). at <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en.>
42. Baur, W. & Rapp, J. *Gesunde Fische: praktische Anleitung zum Vorbeugen, Erkennen und Behandeln von Fischkrankheiten*. (Parey, 2003).
43. Merrifield, D. in *Soy bean and nutrition* 231–250 (2011).
44. van den Ingh, T., Krogdahl, A., Olli, J., Hendriks, H. G. C. J. M. & Koninkx, J. F. J. G. Effects of Soybean-Containing Diets on the Proximal and Distal Intestine in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) – A Morphological-Study. *Aquaculture* **94**, 297–305 (1991).
45. Krogdahl, Å., Lea, T. B. & Olli, J. J. Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* **107**, 215–219 (1994).
46. Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J. M. & Izquierdo, M. S. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.* **11**, 473–490 (2001).
47. Heikkinen, J. *et al.* Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **261**, 259–268 (2006).
48. Desai, A. R. *et al.* Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **350–353**, 134–142 (2012).
49. Francis, G., Makkar, H. P. & Becker, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* **199**, 197–227 (2001).
50. Uribe, C., Folch, H., Enríquez, R. & Moran, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. *Vet. Med. (Praha)*. **56**, 486–503 (2011).
51. Jaber, J. R. *et al.* Hepatosplenic large cell immunoblastic lymphoma in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) with high levels of polychlorinated biphenyl congeners. *J. Comp. Pathol.* **132**, 242–7 (2005).
52. Tort, L., Balasch, J. C. & Mackenzie, S. Fish immune system. A crossroads between innate

- and adaptive responses. *Immunologia* **22**, 277–286 (2003).
53. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, 34–1 (2002).
 54. Li, Y. *et al.* The serpin superfamily in channel catfish: Identification, phylogenetic analysis and expression profiling in mucosal tissues after bacterial infections. *Dev. Comp. Immunol.* **49**, 267–277 (2015).
 55. Kostin, N. N. *et al.* Cloning and characterization of serpin from red king crab *Paralithodes camtschaticus*. *Fish Shellfish Immunol.* **81**, 99–107 (2018).
 56. Pettem, C. M., Briens, J. M., Janz, D. M. & Weber, L. P. Cardiometabolic response of juvenile rainbow trout exposed to dietary selenomethionine. *Aquat. Toxicol.* **198**, 175–189 (2018).
 57. Umasuthan, N. *et al.* Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) serpin, protease nexin-1: Transcriptional analysis and characterization of its antiprotease and anticoagulant activities. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 785–798 (2011).
 58. Zhang, L. *et al.* Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors in teleost fish: Current knowledge and future perspectives. *J. Fish Dis.* **41**, (2018).
 59. Santarpia, L., Lippman, S. M. & El-Naggar, A. K. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **16**, 103–119 (2012).
 60. Zou, J. & Secombes, C. J. Teleost fish interferons and their role in immunity. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 1376–87 (2011).
 61. Abós, B. *et al.* Distinct Differentiation Programs Triggered by IL-6 and LPS in Teleost IgM(+) B Cells in The Absence of Germinal Centers. *Sci. Rep.* **6**, 30004 (2016).
 62. Monte, M. M., Zou, J., Wang, T., Carrington, A. & Secombes, C. J. Cloning, expression analysis and bioactivity studies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-22. *Cytokine* **55**, 62–73 (2011).
 63. Qin, Q. W. *et al.* Tumor necrosis factor alpha (TNF α)-like factor produced by macrophages in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* **11**, 245–256 (2001).
 64. Secombes, C. J. *et al.* Cytokines and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.* **25**, 713–723 (2001).
 65. Zou, J. & Secombes, C. The Function of Fish Cytokines. *Biology (Basel)*. **5**, 23 (2016).
 66. Letterio, J. J. & Roberts, A. B. Regulation of immune responses by TGF β . *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 137–161 (1998).
 67. Harms, C. ., Kennedy-Stoskopf, S., Horne, W. ., Fuller, F. . & Tompkins, W. A. . Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) transforming growth factor- β (TGF- β), and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) assay to measure TGF- β mRNA of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* **10**, 61–85 (2000).
 68. Laing, K. J., Pilström, L., Cunningham, C. & Secombes, C. J. TGF- β 3 exists in bony fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **72**, 45–53 (1999).
 69. Fernandez, E. J. & Lolis, E. Structure, Function, and Inhibition of Chemokines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 469–499 (2002).
 70. Burns, J. M. *et al.* A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J. Exp. Med.* **203**, 2201–2213 (2006).
 71. Chen, L. *et al.* Overexpression of CXC chemokine ligand 14 exacerbates collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* **184**, 4455–4459 (2010).
 72. Starnes, T. *et al.* The chemokine CXCL14 (BRAK) stimulates activated NK cell migration: Implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy. *Exp. Hematol.* **34**, 1101–1105 (2006).
 73. Zilliox, M., Moss, W. & Griffin, D. Gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells during measles virus infection. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 918–923 (2007).
 74. van de Merwe, J., Lindemans, J. & J Mol, G. *Plasma lysozyme levels and decay of neutrophilic granulocytes in patients with Crohn's disease.* *Hepato-gastroenterology* **27**, (1980).
 75. Bruce, T., Neiger, R. & Brown, M. *Gut histology, immunology and the intestinal microbiota of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), fed process variants of soybean meal.* *Aquaculture Research* **49**, (2017).
 76. Booman, M., Forster, I., Vederas, J. C., Groman, D. B. & Jones, S. R. M. Soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) but not in pink salmon (*O. gorbuscha*). *Aquaculture* **483**, 238–243 (2018).
 77. Detection, H. Biomark HD.
 78. Vandesompele, J., Kubista, M. & Pfaffl, M. M. W. Reference Gene Validation Software for Improved Normalization. *Real-time PCR Curr. Technol. Applications* **4**, 47–64 (2009).

79. Bustin, S., Vandesompele, J. & Pfaffl, M. Standardization of qPCR and RT-qPCR. *Omics* **0**, 3–6 (2009).
80. Larionov, A., Krause, A. & Miller, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* **6**, 62 (2005).
81. Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F. & Stewart, C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* **7**, 1–12 (2006).
82. Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* **64**, 5245 LP-5250 (2004).
83. Venold, F. F., Penn, M. H., Krogdahl, Å. & Overturf, K. Severity of soybean meal induced distal intestinal inflammation, enterocyte proliferation rate, and fatty acid binding protein (Fabp2) level differ between strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **364–365**, 281–292 (2012).
84. Hemre, G.-I., Lambertsen, G. & Lie, Ø. The effect of dietary carbohydrate on the stress response in cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* **95**, 319–328 (1991).
85. Blazer, V. S. Nutrition and disease resistance in fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* **2**, 309–323 (1992).
86. Pickering, A. D. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture* **100**, 125–139 (1992).
87. Selye, H. The present state of stress conception. *Munch. Med. Wochenschr.* **95**, 426–433 (1953).
88. Andersen, D. E., Reid, S. D., Moon, T. W. & Perry, S. F. Metabolic Effects Associated with Chronically Elevated Cortisol in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 1811–1817 (1991).
89. Pickering, A. D. & Pottinger, T. G. Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **49**, 232–239 (1983).
90. Carragher, J. F., Sumpter, J. P., Pottinger, T. G. & Pickering, a D. The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**, 310–321 (1989).
91. Schlachter, M. Methodische Untersuchungen zur Stressparametrisierung bei Fischen. (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2011).
92. Noakes, D. L. G. & Leatherland, J. F. Trout , Behavior , Interrenal , Hierarchy , Stress , Dominance , Aggression , *Salmo gairdneri*. **2**, 131–136 (1977).
93. Sloman, K. a, Gilmour, K. M., Metcalfe, N. B. & Taylor, a C. Does socially induced stress in rainbow trout cause chloride cell proliferation? *J. Fish Biol.* **56**, 725–738 (2000).
94. Campbell, P. M., Pottinger, T. G. & Sumpter, J. P. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biol. Reprod.* **47**, 1140–1150 (1992).
95. Gilmour, K. M., Dibattista, J. D. & Thomas, J. B. Physiological causes and consequences of social status in salmonid fish. *Integr. Comp. Biol.* **45**, 263–273 (2005).
96. Haider, G. Hämatologische untersuchungen an Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri* Richardson) IV. Erythrozytenzahl und Hämatokrit. *Hydrobiologia* **37**, 457–472 (1971).
97. M. G. Wells, R. & Weber, R. *Is there an optimal haematocrit for rainbow trout, *Oncorhynchm mykiss* (Walbaum)? An interpretation of recent data based on blood viscosity measurements.* *Journal of Fish Biology* **38**, (1991).
98. Zhou, J., Zhu, X., Cai, Z. & City, S. Endocrine disruptors: an overview and discussion on issues surrounding their impact on marine animals. **2**, (2009).
99. Reid, S. D. & Perry, S. . *The effects and physiological consequences of raised levels of cortisol on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte ??-adrenoreceptors.* *The Journal of experimental biology* **158**, (1991).
100. Putnam, R. & W Freel, R. *Hematological parameters of five species of marine fishes. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology - COMP BIOCHEM PHYSIOL PHYSIOL* **61**, (1978).
101. Jawad, L., A. Al-Mukhtar, M. & K. Ahmed, H. *The relationship between haematocrit and some biological parameters of the Indian Shad, *Tenualosa ilisha* (Family Clupeidae).* *Animal Biodiversity and Conservation* **27**, (2004).
102. Kikuchi, K. Use of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* **179**, 3–11 (1999).
103. Evans, J., PASNIK, D. J., Peres, H., LIM, C. & Klesius, P. *No apparent differences in intestinal histology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed heat-treated and non-heat-treated raw soybean meal.* *Aquaculture Nutrition* **11**, (2005).

104. Weyts, F. A. A., Verburg-van Kemenade, B. M. L. & Flik, G. Characterisation of Glucocorticoid Receptors in Peripheral Blood Leukocytes of Carp, *Cyprinus carpio* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **111**, 1–8 (1998).
105. Weyts, F. A. ., Flik, G. & Kemenade, B. M. L. V. Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **22**, 563–572 (1998).
106. Weyts, F. A. ., Flik, G., Rombout, J. H. W. . & Kemenade, B. M. L. V. Cortisol induces apoptosis in activated B cells, not in other lymphoid cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev. Comp. Immunol.* **22**, 551–562 (1998).
107. Iger, Y., Balm, P. H. M., Jenner, H. A. & Bonga, S. E. W. Cortisol Induces Stress-Related Changes in the Skin of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **97**, 188–198 (1995).
108. Ortuño, J., Esteban, M. A. & Meseguer, J. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish Shellfish Immunol.* **11**, 187–197 (2001).
109. Alvarez-Pellitero, P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **126**, 171–198 (2008).
110. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. & Zumla, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* **6**, 279–84 (2005).
111. Vandesompele, J. Normalization of gene expression : state of the art and preview on a new strategy using expressed Alu repeats. *Bioinformatics* (2005).
112. Kortner, T. M. *et al.* Candidate reference genes for quantitative real-time PCR (qPCR) assays during development of a diet-related enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the potential pitfalls of uncritical use of normalization software tools. *Aquaculture* **318**, 355–363 (2011).
113. Ingerslev, H.-C., Ossum, C. G., Lindenstrøm, T. & Nielsen, M. E. Fibroblasts express immune relevant genes and are important sentinel cells during tissue damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One* **5**, e9304 (2010).
114. Kiron, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Anim. Feed Sci. Technol.* **173**, 111–133 (2012).
115. Beutler, B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* **40**, 845–859 (2004).
116. Philip, A. M., Daniel Kim, S. & Vijayan, M. M. Cortisol modulates the expression of cytokines and suppressors of cytokine signaling (SOCS) in rainbow trout hepatocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **38**, 360–367 (2012).
117. Baumann, H. & Gauldie, J. The acute phase response. *Immunol. Today* **15**, 74–80 (1994).
118. Bayne, C. J. & Gerwick, L. The acute phase response and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.* **25**, 725–743 (2001).
119. De Santis, C., Bartie, K. L., Olsen, R. E., Taggart, J. B. & Tocher, D. R. Nutrigenomic profiling of transcriptional processes affected in liver and distal intestine in response to a soybean meal-induced nutritional stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* **15**, 1–11 (2015).
120. Marjara, I. S., Chikwati, E. M., Valen, E. C., Krogdahl, Å. & Bakke, A. M. Transcriptional regulation of IL-17A and other inflammatory markers during the development of soybean meal-induced enteropathy in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cytokine* **60**, 186–196 (2012).
121. Lilleeng, E., Frøystad, M. K., Vekterud, K., Valen, E. C. & Krogdahl, Å. Comparison of intestinal gene expression in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed standard fish meal or soybean meal by means of suppression subtractive hybridization and real-time PCR. *Aquaculture* **267**, 269–283 (2007).
122. Urán, P. A. *et al.* Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **25**, 751–760 (2008).
123. Lie, Ø., Evensen, Ø., Sørensen, A. & Frøysadal, E. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis. Aquat. Organ.* **6**, 1–5 (1989).
124. Hikima, J., Hirono, I. & Aoki, T. in (eds. Shimizu, N., Aoki, T., Hirono, I. & Takashima, F.) 301–309 (Springer Japan, 2003). doi:10.1007/978-4-431-65938-9_27
125. Saurabh, S. & Sahoo, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac. Res.* **39**, 223–239 (2008).
126. Liu, Y. *et al.* The expression pattern of hsp70 plays a critical role in thermal tolerance of marine demersal fish: Multilevel responses of *Paralichthys olivaceus* and its hybrids (*P. olivaceus* ♀ × *P. dentatus* ♂) to chronic and acute heat stress. *Mar. Environ. Res.* **129**, 386–395 (2017).
127. Tomanek, L. & Sanford, E. Heat-shock protein 70 (Hsp70) as a biochemical stress indicator: an

- experimental field test in two congeneric intertidal gastropods (genus: Tegula). *Biol. Bull.* **205**, 276–84 (2003).
128. Yamashita, M., Yabu, T. & Ojima, N. Stress Protein HSP70 in Fish. *Aqua-BioScience Monogr.* **3**, 111–141 (2010).
 129. Tort, L. Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 1366–75 (2011).
 130. N. Alexis, M. *Comparative evaluation of soybean meal and carob seed germ meal as dietary ingredients for rainbow trout fingerlings.* *Aquatic Living Resources* **3**, (1990).
 131. Yamamoto, T. *et al.* Influence of fermentation conditions for soybean meal in a non-fish meal diet on the growth performance and physiological condition of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss.* *Aquaculture* **309**, 173–180 (2010).
 132. Gomes, E. F., Rema, P., Gouveia, A. & Teles, A. O. Replacement of fish meal by plant proteins in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of the quality of the fishmeal based control diets on digestibility and nutrient balances. *Water Sci. Technol.* **31**, 205–211 (1995).
 133. M Gatlin III, D. *et al.* *Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review.* *Aquaculture Research* **38**, (2007).
 134. Gregory, T. R. & Wood, C. M. The Effects of Chronic Plasma Cortisol Elevation on the Feeding Behaviour, Growth, Competitive Ability, and Swimming Performance of Juvenile Rainbow Trout. *Physiol. Biochem. Zool.* **72**, 286–295 (1999).
 135. Pickering, A. D. Growth and stress in fish production. *Aquaculture* **111**, 51–63 (1993).
 136. Sathiyaa, R., Campbell, T. & Vijayan, M. M. Cortisol modulates HSP90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **129**, 679–85 (2001).
 137. Oliva-Teles, A., Gouveia, A. J., Gomes, E. & Rema, P. The effect of different processing treatments on soybean meal utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.* *Aquaculture* **124**, 343–349 (1994).
 138. J. Rackis, J., H Honig, D., J. Sessa, D. & R. Steggerda, F. *Flavor and flatulence factors in soybean products.* *Journal of agricultural and food chemistry* **18**, (2002).
 139. Kaushik, S. J. *et al.* Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.* *Aquaculture* **133**, 257–274 (1995).
 140. Refstie, S., J. Helland, S. & Storebakken, T. *Adaptation to soybean meal in diets for rainbow trout, Oncorhynchus mykiss.* *Aquaculture* **153**, (1997).
 141. Barron, M., D. Tarr, B. & Hayton, W. *Temperature-dependence of cardiac output and regional blood flow in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson.* *Journal of Fish Biology* **31**, (2006).
 142. Karl, H. *et al.* *Biofisch – Qualitätsvergleich zwischen konventionellen und ökologisch produzierten Forellen.* (2004).
 143. Arnheiter, H. & Staeheli, P. Expression of interferon dependent resistance to influenza virus in mouse embryo cells. *Arch. Virol.* **76**, 127–137 (1983).
 144. Thimme, R., Frese, M., Kochs, G. & Haller, O. Mx1 but Not MxA Confers Resistance against Tick-Borne Doherty Virus in Mice. *Virology* **211**, 296–301 (1995).
 145. Frese, M., Kochs, G., Feldmann, H., Hertkorn, C. & Haller, O. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J. Virol.* **70**, 915–923 (1996).
 146. Lima, P. C., Harris, J. O. & Cook, M. Exploring RNAi as a therapeutic strategy for controlling disease in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* **34**, 729–743 (2013).
 147. Whyte, S. K. The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.* **23**, 1127–1151 (2007).
 148. Giffen, P. S. *et al.* Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Arch. Toxicol.* **77**, 392–402 (2003).
 149. Spencer-Segal, J. L. & Akil, H. Glucocorticoids and resilience. *Horm. Behav.* (2018). doi:<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.11.005>
 150. Dutcher, J. M. & Creswell, J. D. The role of brain reward pathways in stress resilience and health. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **95**, 559–567 (2018).

10 Im Berichtszeitraum realisierte Veröffentlichungen

10.1 Bisherige Aktivitäten

- Einfluss von Sojaprotein auf Wachstumsleistung und Auftreten von Stressparametern im Blut von Forellen. **Masterarbeit** zur Erlangung des akademischen Grades „Master of Science“ in Biologie. Vorgelegt von Laura Schynawa. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Zoologisches Institut. 2016, 1-56.
- Analysis of mRNA expression of stress regulated genes in blood of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Bachelorarbeit** zur Erlangung des akademischen Grades „Bachelor of Science“ in Biologie. Vorgelegt von Jonas Müller. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Zoologisches Institut. 2017, 1-55.
- Seibel, H., Stress resistance and –adaptation of trout from intensive and extensive management under defined management conditions. **Vorträge** an der Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. 2015, 2016, 2017.
- Seibel, H., Neue Wege in der Stressdiagnostik bei Fischen. **Vortrag** auf dem Büsumer Fishtag. 09.06.2016
- Seibel, H., Fische und Stress – Tierschutzaspekte auf molekularbiologischer Ebene. **Vortrag** auf dem Büsumer Fishtag. 08.06.2017
- Seibel, H., Stress resistance and –adaptation of trout from intensive and extensive management under defined management conditions. A molecular approach. **Vortrag** auf der 18. International conference on diseases of fish and shellfish, EAFP Tagung in Belfast 04.-08.09.2017.
- Seibel, H., Fische und Stress – eine Einführung. **Ringvorlesung** „Nachhaltige Aquakultur“ des Exzellenzclusters „Ozean der Zukunft“ SS 2018, 16.05.2018.
- Seibel, H., Schulz, C., Fische und Fütterungsstress – ein molekularbiologischer Ansatz. **Vortrag** auf der XVII. Gemeinschaftstagung der deutschsprachigen Sektionen der EAFP zum Thema Fischkrankheiten; 03.-07.10.2018.
- Ergebnisse wurden in die **Vorlesung** AEF-agr056 „Gesundheit von Fischen“ an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, Institut für Tierzucht und Tierhaltung integriert und damit an Masterstudenten der Fachbereiche Biologie, Agrarwissenschaften und Ökotoxikologie weitergegeben.

10.2 Geplante Aktivitäten

Präsentation der Endergebnisse auf der 19th internationalen Konferenz on diseases of fish and shellfish, EAFP Tagung in Porto (September/Oktober 2019) und der Aquakulture Europe in Berlin (Oktober 2019) .

Die Titel für **Veröffentlichungen** in per-reviewten Journals (z. B. Fish and Shellfish Immunology, Aquaculture, Developmental and Comparative Immunology) sind erste Vorschläge:

- Seibel, H., Rebl, A., Schulz, C.: Effects on welfare of the replacement of fish meal by soy bean meal in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
- Seibel, H., Chikwati, E., Schulz, C.: Gut histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with high amounts of soy bean meal. A model for feedingstress?
- Seibel, H., Rebl, A., Schulz, C.: mRNA gene expression from blood of soy bean meal fed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

II Anhang zum Schlussbericht: kurz gefasster Erfolgskontrollbericht

1 Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen

Das Vorhaben nimmt insofern Bezug auf die Ziele der Richtlinie des BMELV zur „Förderung von Forschungs- und Entwicklungsvorhaben sowie von Maßnahmen zum Technologie- und Wissenstransfer für eine nachhaltige Erzeugung, Verarbeitung und Vermarktung von landwirtschaftlichen Produkten“, als dass in ihr auswertbare Parameter entwickelt wurden, um mit Entzündungen korrespondierenden Stress objektiv, statistisch beurteilen zu können. Damit werden, gemäß der förderpolitischen Ziele der Richtlinie Rahmenbedingungen für die Ausdehnung einer nachhaltigen Landwirtschaft und Lebensmittelwirtschaft verbessert. Die Fortführung der Untersuchungen und Etablierung eines einfachen Detektionssystems würde auch einfach anwendbar den Nachweis von Stress bei Forellen – der auch jetzt schon im Labor möglich ist – möglich machen. Auf diese Weise ergibt sich eine neue Facette in der Beurteilung des Wohlbefindens des Produktes Fisch während seiner Lebenszeit in der Produktion, die bisher teils nicht transparent nachvollziehbar ist.

2 Wissenschaftliche und technische Ergebnisse des Vorhabens

Technische Ergebnisse wurden in diesem Vorhaben nicht geniert.

An wissenschaftlichen Ergebnissen wurden essentielle neue Erkenntnisse über das Verhalten von verschiedenen, minimal invasiv aus Blut detektierbaren Parametern aus den Bereichen der übergeordneten regulierten Signaltransduktionswege wie der SERPIN G Superfamilie, der intrazelluläre PI3K/Aktin-, Toll-like Rezeptor-, NF- κ B-, MAP-Kinase- und JAK-STAT-Signaltransduktion und intrazelluläre Pathogenerkennungszellrezeptoren, sowie pro- und anti-inflammatorischer Zytokine, Chemokine, Stoffe die an der Akuten-Phase-Reaktion, Komplementkaskade oder Entzündungsreaktionen beteiligt sind und Hitzeschockproteine, sowie das Verhalten bestimmter Zellpopulation auf ihren Zusammenhang mit Stress untersucht. Dazu wurde zum einen ein Fütterungsstressmodell mit Sojabohnenmehl verwendet und es wurden zwei Forellenherkünfte, aus Starnberg und Wielenbach in jeweils ökologisch intensiver und extensiver Haltung miteinander verglichen. Da bei dem Versuch scheinbar eine natürliche Virusinfektion ausgebrochen ist, konnte die mRNA Expression der zu den oben genannten Gruppen zugehörigen Gene auch in Bezug auf Stress bei/ nach einer Virusinfektion getestet werden.

Die Arbeitsziele bieten eine Verknüpfung zwischen den Bereichen der Grundlagen- und der angewandten Forschung, in dem sie die Grundlage bieten, um minimal invasive, sehr praxistaugliche Detektionssysteme zu entwickeln, dessen Erhebung dann auch im Sinne der Aquakultur 4.0 digital denkbar ist.

Wann die Anpassung an Stress erfolgt, ist bisher noch nicht geklärt, es ist jedoch anzunehmen, dass diese bereits in einem frühen Entwicklungsstadium geschieht. Die Ergebnisse stellen sich so dar, dass die eher extensiv aufgezogenen Wielenbacher Forellen auch später mit den extensiven Bedingungen besser zurechtkamen als die eher intensiv aufgezogenen Starnberger-Forellen und umgekehrt. Daher kann auch die Empfehlung gegeben werden, dass sofern die Besatzfischproduktion nicht im eigenen Betrieb möglich Besatzmaterial aus Betrieben mit eher extensiver Besatzdichte zugekauft werden sollte, wenn nicht direkt ökologisch produziertes Besatzmaterial zur Verfügung steht, da selbst die

ökologisch intensiven Besatzdichten mit maximal 25 kg/ m³ im Vergleich zur konventionellen Aquakultur mit teilweise sehr viel größeren Fischmengen als niedrig anzusehen sind.

Als weitere wichtige Nebenerkenntnisse wurde die RNA Isolierung und qPCR für die Untersuchung von Fischblut etabliert. Es stellte sich heraus, dass hierfür spezielle Primer benötigt werden, da sich auf Grund kernhaltiger roter Blutkörperchen bei Fischen ein sehr hohes Aufkommen an genomischer DNA in den Blutproben befindet, welche mittels verschiedener Schnitte aus der Probe entfernt werden muss, da sonst zu hohe Kopienzahlen pro µg RNA gemessen und die Ergebnisse verfälscht werden.

Für die Untersuchung von Stress ist es von entscheidender Bedeutung vorher eine ausführliche Recherche zu betreiben, welcher Stressmarker geeignet ist. Denn wenn nicht der „richtige“ Marker untersucht wird, so werden schnell falsch negative Ergebnisse generiert. Die Ergebnisse illustrieren anschaulich, dass der Stress immer spezifisch in seiner Art für eine spezifische Fischart betrachtet werden muss. Hier wurden tierart- und haltungsspezifische Daten erhoben, die auf andere Regionen und Betriebe übertragbar sind. Darüber hinaus zeigte sich deutlich das Cortisol starke individuelle Schwankungen in Blut aufweist und der Hämatokrit Gewichtsabhängig ist. Dieser wird aber bei der Beschreibung von Stress in Veröffentlichungen oftmals nicht mit dem Gewicht in Beziehung gesetzt. Keine signifikanten Unterschiede ergaben beim HSI, SSI oder dem Differentialblutbild, während die Futtermittelaufnahme und Gewichtszunahme trotz einiger Nachteile als kostengünstiger praxisrelevanter „welfare“-Indikator herangezogen werden kann.

Darüber hinaus wurde ein Fütterungsstressmodell entwickelt. Diese Ergebnisse sind in der Futtermittelforschung, bspw. zur Überprüfungen von Stressmindernden oder Entzündungshemmenden Futterzusatzstoffen anwendbar und ein wichtiges Nebenergebnis dieser Studie.

Die Projektergebnisse stellen damit langfristig eine fundierte Bewertungsgrundlage für das Auftreten von Stress bei Forellen dar. „Animal welfare“ kann dann weiter konkretisiert werden. Das Vorhaben bietet somit die Möglichkeit einer fundierten Einschätzung der Gesundheitsprophylaxe und Aufrechterhaltung eines hohen Tierschutzstandards, der den tierartspezifischen, verhaltensbedingten Bedürfnissen genügt, wie sie in der „EG-Öko-Verordnung“ gefordert werden.

3 Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen

Keine.

4 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Zurzeit nicht relevant. Die Ergebnisse bieten eine erste wichtige Grundlage, um minimal invasive, sehr praxistaugliche Detektionssysteme, vergleichbar eines Diabetes- oder Schwangerschaftstests zu entwickeln. Im Sinne der Aquakultur 4.0 wäre die Auswertung auch digital denkbar. Bei Durchführung eines Anschlussprojektes zur vertieften Evaluierung in Zusammenarbeit mit einem Industriepartner erscheint ein Zeithorizont von 5 Jahren realistisch.

5 Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten

Schon jetzt sind die im Projekt generierten Ergebnisse in die akademische Lehre der CAU eingeflossen und auf verschiedenen Fachkonferenzen vorgestellt und diskutiert worden. Anfang 2019 werden sie in einschlägigen referierten, wie auch nicht referierten, nationalen

und internationalen Fachzeitschriften publiziert. In Ergänzung dazu werden die Ergebnisse weiterhin in Form von Präsentationen auf wissenschaftlichen Konferenzen, auf Branchenspezifischen Fachtagungen, sowie im Rahmen populärwissenschaftlicher Vorträge einem breiten Publikum zugänglich gemacht. Die enge Vernetzung des Antragstellers (CAU/ GMA) mit nationalen und internationalen privatwirtschaftlichen Betrieben im Bereich Fischzuchtbetrieben und Gesundheitsmonitoring, sowie eine gute Kooperation mit der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft ermöglicht darüber hinaus einen langfristigen Wissenstransfer in die wirtschaftliche fischerreiche Praxis, den Handel und zum Verbraucher.

Die Ergebnisse fließen in weitere vom Projektnehmer durchgeführte Projekte, wie ein von der DBU gefördertes Projekt (AZ 33835-01) zur Erarbeitung von Tierschutzindikatoren in der deutschen Forellenzucht mit ein. Die Antragsteller engagieren sich sehr im Bereich Tierschutz in der deutschen Aquakultur. Zu diesem Thema sind mehrere Veröffentlichungen und Vorträge während des Projektzeitraums entstanden¹. Ein DLG Merkblatt (Nr. 441; „Tierschutzaspekte in der Forellenzucht“) wurde verfasst und lag bereits auf der diesjährigen EUROTier aus. Auch hier fließen die Ergebnisse in eine fundierte Bewertung, die immer praxistauglich und –nahe bleiben soll, mit ein. Informationen werden immer auch Verbraucherfreundlich aufgearbeitet. Anfang 2019 wird ein Praxisseminar „Wann ist dem Fisch wohl?“ in Kooperation mit der DLG-Akademie für Fischzüchter, Quereinsteiger, Berater und Tierärzte durchgeführt, welches Fachkompetenz zur Beurteilung von Kondition und Wohlbefinden des Fischbestandes vermitteln soll, um möglichst frühzeitig Abweichungen zu registrieren.

6 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Um die Ergebnisse einfach und kostengünstig in die Praxis zu transferieren ist die Entwicklung eines Blutschnelltestes – ähnlich eines Diabetestests – denkbar. Dieser würde die Stressdetektion sofort, vor Ort ermöglichen. Dazu müsste ein Anschlussprojektes zur vertieften Evaluierung in Zusammenarbeit mit einem Industriepartner durchgeführt werden.

Außerdem haben sich erste Hinweise darauf ergeben, dass die übergeordneten Stressmarker auch zur Detektion von Transportstress geeignet sind, dies müsste ebenfalls noch weiter evaluiert werden. Gerade Transportstress, wie auch Handlingstress sind Faktoren, die bei Plänen zur Vermeidung von Stress bei Fischen immer mehr in den Fokus rücken. Dies hat nicht nur tierschutzrelevante Gründe, sondern kann auch Einfluss auf die Produktqualität nehmen. Ein zunächst Grundlagen bezogenes Forschungsprojekt ist Voraussetzung würde sich auf die systemische molekulare Reaktion von Regenbogenforellen auf die wichtigsten Stressoren ‚Temperatur‘ und ‚Sauerstoffgehalt‘ *in vivo* in der Haut und im Blut sowie die entsprechende zelluläre Reaktion *in vitro* anhand

¹ z. B. aktuell:

- Seibel, H.: Stress lass nach – wie kann man die physiologische Stressreaktion von Fischen als Indikator für Tiergerechtigkeit nutzen? Messe Bremen, Workshop „Animal welfare“, 26.02.2018
- Seibel, H., Weirup, L. und Schulz, C.: Aspects of animal welfare in fish husbandry. In: Professionals in food chains, EurSafe 2018, Wien, 15.06.2018.
- Seibel, H., Weirup, L. und Schulz, C. (2018). Aspects of animal welfare in fish husbandry. In: Professionals in food chains, EurSafe 2018, Vienna, Austria; eds. Springer S. und Grimm H., Wageningen Academic Publishers, ISBN 978-90-8686-321-1; Section 13, Seite 439-443.
- Seibel, H., Weirup, L. und Schulz C. (2019). Animal welfare and aquaculture. A Special Issue of Food Ethics: Ethical seafood? - Fisheries and Aquaculture at the Crossroads. Issue editors: Matthias Kaiser & Mimi E. Lam. *In review*
- M. Schumann und H. Seibel (2018). Tierwohl in der Aquakultur. Massentierhaltung unter Wasser? in der Schriftenreihe "Theorie und Praxis starker Nachhaltigkeit" im Metropolis Verlag. *In review*
- Weirup, L., Seibel, H. (2018). Aquakultur aus der Sicht des Tierwohls. In: Haben Tiere Rechte? Wissenschaftsreihe der Bundeszentrale für politische Bildung. *In review*

verschiedener Zellkulturen konzentrieren mit dem Ziel mit Hilfe von modernsten molekularbiologischen Verfahren (u. a. Multiplex-Arrays) die Biomarker aus den in-vivo- und in-vitro-Versuchen zu evaluieren. Korrelationen geeigneten Markern sollen am Ende des Projektes dazu führen, diese hinsichtlich ihrer Eignung für ein zukünftiges Fischwohl-Testsystem zu überprüfen und für eine Applikation in einer möglichen Folgestudie, bspw. in Form eines Diagnostik - Biochip, bewerten zu können. Die grundlegenden Vorarbeiten sind notwendig, um gezielt die Stressoren Temperatur und Sauerstoff ansprechen zu können. Ein Kooperationsprojekt mit dem EMB Fraunhofer Institut in Lübeck und dem Leibnitz Institut für Nutztierbiologie in Dummerstorf sind hier möglich.

Neuste Forschungshypothesen gehen davon aus, dass neuronale Wege, die Resilienz fördern, zum Zeitpunkt des Stresses eingeleitet werden und dass sie eine Glukokortikoidsignalisierung neuronal beeinflussen. An dieser Stelle ergeben sich neue Fragestellungen in Bezug auf die Resilienzinduktion bei Forellen und anderen Fischarten. Forschungen gibt es bisher noch nicht dazu. Gerade in Bezug auf die durch die Tierschutzdebatte aufgeflamnte und in der Öko-VO konsolidierte Forderung nach stressresistenten Fischen gibt es bisher erste Forschungen auf der Ebene der Züchtung und auch eine scheinbar gute Anpassung an konventionelle Haltungsdichten aber bisher noch keine tatsächlich in die Praxis umgesetzten Bestrebungen für die Anpassung an ökologische Haltungssysteme. Erste Forschungen an Zebrafischen zeigen z. B. dass die Fische im adulten Lebensstadium stressresistenter sind, wenn sie im juvenilen Stadium Stress ausgesetzt waren^{149,150}. Sollten sich vergleichbar Mechanismen auch für Forellen bestätigen oder für andere in der Aquakultur gezüchtete Arten, so könnten schon sehr frühzeitig eine tatsächliche Selektion auf Stressresistenz bzw. die Beeinflussung der physiologischen Stressreaktion in Form einer Resilienzsteigerung denkbar sein. Versuche dazu könnten an der GMA in Kooperation mit der Universität Ghent, Prof. Johan Aerts, welcher Spezialist auf dem Gebiet der Glukokortikoidforschung ist durchgeführt werden. Die Ergebnisse einer derartigen Studie sind direkt in die Praxis umsetzbar, da es bei Gelingen möglich wird die Aufzucht von Satzfishen in der Form zu beeinflussen, dass die juvenilen Mastfische schon von sich aus nicht so gestresst – mit all seinen Folgen – reagieren. Dieser Ansatz ist innovativ, da Züchtungsmethoden dies nicht so schnell erreichen können.

Außerdem, ganz generell, gibt es für andere in Aquakultur produzierte Fischarten wie Zander, Tilapien, Doraden oder Welse bisher noch nicht einmal grundlegende Erkenntnisse über das Verhalten und den Einfluss von Stress.

7 Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Entfällt.

8 Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Die Zeitplanung wurde – trotz sehr viel umfangreicherer Untersuchungen vollständig eingehalten. Bei der Ausgabenplanung wurde im Bereich der Personalgelder zu gering kalkuliert. Durch einen Mehraufwand an Arbeitszeit im Projekt durch Primerdesign, Etablierung und zeitliche Verschiebung von Teilen des Praxisversuchs ergab sich zusammen mit der Tarifsteigerung von 2,35 % ein finanzielles Minus zum Projektende von 5649,58 €.