

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg**

**Fakultät Life Sciences**

Department Biotechnologie

**Bachelorthesis**

Die proteolytische Verdauungsenzymkapazität in Abhängigkeit vom Futterregime bei den Larvenstadien von Goldbrassen (*Sparus aurata*)

B. Sc. Biotechnologie

vorgelegt von

**Diana Mikhaylovskaya**



Hamburg, den 20.12.2022

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Julien Béthune (HAW Hamburg)
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. Carsten Schulz (CAU Kiel)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der Fraunhofer Einrichtung für Individualisierte und Zellbasierte Medizintechnik Außenstelle Büsum



## **Danksagung**

Mein Dank gilt der Fraunhofer Einrichtung für Individualisierte und Zellbasierte Medizintechnik für die Möglichkeit meine Bachelorthesis und die zugehörigen Experimente dort durchführen zu können.

Außerdem würde ich gerne unter anderem den folgenden Personen für ihre großartige Hilfe danken:

Ich danke allen Mitarbeitern des IMTE der Außenstelle Büsum für Ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft während und nach meiner Zeit dort.

Besonderer Dank gilt hierbei Dr. Bernd Ueberschär, welcher mich intensiv gefördert und sein Fachwissen mit mir geteilt hat, und Beeke Roehe, welche mich in die Welt der Fischlarven eingeführt hat und bei der ich an der Larvenaufzucht mitarbeiten konnte.

Mein Dank gilt auch insbesondere Nadine Wenke, Matteo Pauly und Anna Simon, welche mich an harten Labortagen durch Rat und Taten, aber auch mit Tee und Leckereien unterstützt haben.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Julien Béthune und Prof. Dr. Carsten Schulz für die Betreuung und Begutachtung meiner Bachelorarbeit.

Und zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich bedingungslos mit und bei allem unterstützt, bestärkt und ermutigt haben.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Abbildungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	XI
Zusammenfassung .....	12
1. Einleitung .....	13
1.1 <i>Sparus aurata</i> .....	15
1.2 Ernährung mariner Fischlarven.....	16
1.2.1 Lebendfutter .....	17
1.2.2 micro diets.....	20
1.3 Verdauungsphysiologie mariner Fischlarven .....	22
1.3.1 Entwicklung des Verdauungstraktes bei <i>Sparus aurata</i> .....	22
1.3.2 Verdauungsenzym Trypsin.....	23
1.4 Zielsetzung .....	25
2. Material und Methoden.....	26
2.1 Materialien .....	26
2.1.1 Geräte .....	26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	27
2.1.3 Chemikalien .....	27
2.1.4 Microalgen und micro diets .....	28
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	28
2.1.6 Kits .....	28
2.2 Hälterung.....	29
2.2.1 Aufbau des Larvenmoduls.....	29
2.2.2 Versuchsablauf der Larvenaufzucht ( <i>Sparus aurata</i> ).....	31
2.2.3 Überwachung und Dokumentation der Wasserparameter .....	33
2.2.4 Fütterungsregime .....	40
2.2.5 Bereitstellung des Lebendfutters.....	44
2.2.6 micro diets.....	50
2.2.7 Probenentnahme.....	52
2.3 Erhebung der Mortalitätsrate .....	53
2.4 Erhebung der Wachstumsdaten .....	53
2.5 Methoden der Trypsinanalyse .....	54

## Inhaltsverzeichnis

2.5.1	Funktionalität der Messmethode .....	55
2.5.2	Verwendbarkeit der Messmethode .....	55
2.5.3	Probenvorbereitung .....	57
2.5.4	Fluoreszenzphotometrische Messung der Enzymaktivität .....	59
2.6	Statistische Analyse .....	60
3.	Ergebnisse .....	60
3.1	Mortalitätsrate .....	60
3.2	Wachstumsdaten .....	63
3.2.1	Längen- und Höhenwachstum .....	63
3.2.2	Trockengewicht .....	68
3.3	Trypsinaktivität .....	72
3.3.1	Kalibrierung und Trypsinstandardkurve .....	72
3.3.2	Ergebnisse der Trypsinaktivität .....	73
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	86
4.	Diskussion .....	86
4.1	Mortalitätsrate .....	87
4.2	Trypsinaktivität .....	90
4.2.1	Trypsinaktivität nach dem Larvenalter .....	91
4.2.2	Trypsinaktivität nach der Larvenlänge .....	94
4.3	Wachstumsrate und Trockengewicht .....	96
5.	Versuchs- und Methodenkritik .....	100
6.	Schlussfolgerung und Aussicht .....	102
7.	Literaturverzeichnis .....	103
8.	Anhang .....	i
8.1	Darstellungen zur Veranschaulichung des Außenbeckens .....	i
8.2	Mengen der MD pro Treatment .....	ii
8.3	Mortalitätsraten pro Treatments .....	iv
	Eidesstattliche Erklärung .....	vii

## Abkürzungsverzeichnis

<i>A. panamensis</i> .....	<i>Apocyclops panamensis</i>
<i>A. salina</i> .....	<i>Artemia salina</i>
<i>A. tonsa</i> .....	<i>Acartia tonsa</i>
<i>B. plicatilis</i> .....	<i>Brachionus plicatilis</i>
BSA .....	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BZ-L-Arg-MCA .....	<i>N<math>\alpha</math>-Benzoyl-L-Arginin-4-Methylcoumarinyl-7-Amid</i>
CaCl <sub>2</sub> * H <sub>2</sub> O .....	<i>Calciumchlorid-Dihydrat</i>
CCK .....	<i>Cholecystokinin</i>
DHA .....	<i>Docosahexaensäure, Docosahexaensäure</i>
DMSO .....	<i>Dimethylsulfoxid</i>
dph .....	<i>days post hatching</i>
EPA .....	<i>Eicosapentaensäure</i>
EPH .....	<i>Eicosapentaensäure</i>
FAA .....	<i>freie Aminosäuren</i>
HUFA .....	<i>hochungesättigte Fettsäuren, highly unsaturated fatty acids</i>
MCA .....	<i>Fluorophor 4-methylcoumarinyl-7-amid</i>
MD .....	<i>micro diets, mikropartikuläre Futtermittel</i>
<i>S. aurata</i> .....	<i>Sparus aurata</i>
SL .....	<i>Standardlänge</i>
TL .....	<i>Totallänge</i>
TRIS .....	<i>Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan</i>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Entwicklung der Fischversorgung über die Fangfischerei und die Aquakultur weltweit, sowie Gegenüberstellung zur Weltbevölkerung mit Durchschnittlichem Pro-Kopfkonsum und der Verwendung von Fisch für Nicht-Lebensmittelanwendungen.....	13
Abbildung 2 Vereinfachte Darstellung des technischen Aufbaus eines Außenbeckens des Larvenmoduls als Ansicht von oben. ....	31
Abbildung 3 Veranschaulichung der Aufzuchtstankverteilung in die einzelnen Futtergruppen im Larvenmodul. ....	33
Abbildung 4 Darstellung des Temperaturverlaufs in beiden Außenbecken über den gesamten Versuchszeitraum. ....	35
Abbildung 5 Aufzeichnung der während der Versuchszeit gemessenen Sauerstoffkonzentration und -sättigung beider Außenbecken. ....	36
Abbildung 6 Aufzeichnung der während der Versuchszeit gemessenen Salinitäten beider Außenbecken. ....	38
Abbildung 7 Aufzeichnung der während der Versuchszeit gemessenen pH-Werte beider Außenbecken. ....	39
Abbildung 8 Aufzeichnung der während der Versuchszeit gemessenen Ammonium- und Nitritgehalte beider Außenbecken. ....	40
Abbildung 9 Fütterungsregime der vier verwendeten Treatments mit schematischer Darstellung einzelner Fütterungskomponenten. ....	42
Abbildung 10 Veranschaulichung der verfütterten Copepodenindividuen pro Milliliter je Fütterungsevent, die verfütterte Menge pro Milliliter insgesamt an einem Tag und die Anzahl der Fütterungsevents für die Treatments 2 und 4. ....	45
Abbildung 11 Veranschaulichung der verfütterten Rotatorienindividuen pro Milliliter je Fütterungsevent, die verfütterte Menge pro Milliliter insgesamt an einem Tag und die Anzahl der Fütterungsevents für die Treatments 1 (Kontrolltreatment) und 3. ....	47
Abbildung 12 Veranschaulichung der verfütterten, frischen Artemien für das Treatment 1 (Kontrolltreatment) und das Treatment 2. ....	49
Abbildung 13 Veranschaulichung der verfütterten, angereicherten Artemien für das Kontrolltreatment (Treatment 1) und das Treatment 2. ....	49
Abbildung 14 Gemittelte Menge der verfütterten MD in Gramm in 24 Stunden über den gesamten Versuchszeitraum für alle Treatments. ....	50

Abbildungsverzeichnis	
Abbildung 15 Darstellung der Prozessschritte .....	58
Abbildung 16 Darstellung der kumulativen Mortalitätsrate .....	62
Abbildung 17 Darstellung des Längenwachstums für die vier verschiedenen Treatments und der Ausgangswert der Larvenlänge zum Zeitpunkt der Ankunft am Fraunhofer Institut in Büsum („Ankunftsdaten“) gegen das Larvenalter (dph). .....	64
Abbildung 18 Darstellung des Höhenwachstums der Fütterungsregime und der Ausgangswert der Larvenhöhe zum Zeitpunkt der Ankunft am Fraunhofer Institut in Büsum („Ankunftsdaten“) gegen das Larvenalter (dph). .....	65
Abbildung 19 Darstellung der Trendlinien der Treatments von der Auftragung des Larvenhöhe in Millimeter gegen die Larvenlänge in Millimeter. ....	66
Abbildung 20 Darstellung des Vergleiches der Larvenlängen der verschiedenen Treatments in Millimetern gegen das Larvenalter in dph als Kastengrafik. ....	67
Abbildung 21 Auftragung der Trockengewichte der einzelnen Treatments und Ausgangswert des Larvengewichts zum Zeitpunkt der Ankunft am Fraunhofer Institut in Büsum („Ankunftsdaten“) gegen das Larvenalter (dph). ....	69
Abbildung 22 Darstellung des Larvengewichtes in Milligramm gegen die Larvenlänge in Millimeter der einzelnen Treatments. ....	70
Abbildung 23 Darstellung des Vergleiches der Trockengewichte der Larven der verschiedenen Treatments in Milligramm gegen das Larvenalter in dph als Kastengrafik.....	71
Abbildung 24 Verwendete Trypsinstandardkurve mit 1:250 Trypsin aus Schweinepankreas von SERVA.....	72
Abbildung 25 Eichkurve mit MCA von Bachem.....	73
Abbildung 26 Legende der Pfeile für die Abbildungen der gemessenen Trypsinaktivität gegen das Larvenalter. ....	74
Abbildung 27 Darstellung der gemittelten Trypsinaktivität über den gesamte Versuchszeitraum gegen das Larvenalter von 0 – 56 dph. ....	75
Abbildung 28 Darstellung der gemittelten Trypsinaktivität der verschiedenen Treatments nach Larvenalter (dph) mit den Ankunftsdaten (0 dph bis 35 dph). ....	76
Abbildung 29 Darstellung der Trypsinaktivität (hydrolysiertes MCA in nmol/min) aller Treatments gegen das Larvenalter in days post hatching als Kastengrafik. ....	77
Abbildung 30 Darstellung der gemittelten Trypsinaktivität (hydrolysiertes MCA in nmol/min) der Tanks des Treatments 2 gegen das Larvenalter in dph. ....	78



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 31 Darstellung der Trypsinaktivität (hydrolysiertes MCA in nmol/min) der verschiedenen Treatments gegen das Larvenalter (dph) mit den Ankunftsdaten (0 dph bis 40 dph). .....	79
Abbildung 32 gemittelte Trypsinaktivität in den verschiedene Treatments nach Larvenalter in dph (35 dph bis 56 dph).....	80
Abbildung 33 Legende der Balkenbefüllung für die Längengruppierungsdarstellung (Trypsinaktivität gegen Längengruppen). .....	81
Abbildung 34 Darstellung der gemittelten Trypsinaktivitäten innerhalb der Längengruppen gegen die Larvengröße in Millimeter. ....	82
Abbildung 35 Darstellung der gemittelten Trypsinaktivität innerhalb der Längengruppen bei allen Treatments aufgetragen gegen Länge der Larven in Millimeter (2,5 – 10,5 mm).....	83
Abbildung 36 Darstellung der Trypsinaktivität (hydrolysiertes MCA in nmol/min) der verschiedenen Treatments gegen die Larvenlänge in Millimeter (2,5 – 10,5 mm). ...	84
Abbildung 37 Darstellung der gemittelten Trypsinaktivität bei allen Treatments aufgetragen zur Größe der Larven in Millimeter (10,6 – 20,0 mm und > 20,0 mm)...	85
Abbildung 38 Fotografische Darstellung des Außenbeckens. Foto: Dr. Bernd Ueberschär, BioServe .....	i
Abbildung 39 Menge der verfütterten MD in Gramm über den Versuchszeitraum für das Treatment 1 in den Tanks 1, 8, 17 und 20. ....	ii
Abbildung 40 Menge der verfütterten MD in Gramm über den gesamten Versuchszeitraum für Treatment 2 in den Tanks 11, 12, 16 und 21. ....	ii
Abbildung 41 Menge der verfütterten MD in Gramm über den gesamten Versuchszeitraum für Treatment 3 in den Tanks 2, 4, 19 und 24. ....	iii
Abbildung 42 Menge der verfütterten MD in Gramm über den gesamten Versuchszeitraum für Treatment 4 in den Tanks 6, 9, 14 und 18. ....	iii
Abbildung 43 Darstellung der kumulativen Mortalitätsrate in Prozent und der gemittelten täglichen Mortalitätsrate in Prozent des Kontrolltreatments während des Versuchszeitraumes.....	iv
Abbildung 44 Darstellung der kumulativen Mortalitätsrate in Prozent und der gemittelten täglichen Mortalitätsrate in Prozent des Treatments 2 während des Versuchszeitraumes.....	iv

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 45 Darstellung der kumulativen Mortalitätsrate in Prozent und der gemittelten täglichen Mortalitätsrate in Prozent des Treatments 3 während des Versuchszeitraumes. ....	v
Abbildung 46 Darstellung der kumulativen Mortalitätsrate in Prozent und der gemittelten täglichen Mortalitätsrate in Prozent des Treatments 4 während des Versuchszeitraumes. ....	v
Abbildung 47 Darstellung der kumulativen Mortalitätsrate in Prozent und der gemittelten täglichen Mortalitätsrate in Prozent des Treatments 4 während des Versuchszeitraumes. ....	vi

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Verwendete Geräte.....	26
Tabelle 2 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 3 Verwendete Chemikalien.....	27
Tabelle 4 Verwendete Microalgen und micro diets.....	28
Tabelle 5 Verwendete Puffer und Lösungen und ihre Ansetzung.....	28
Tabelle 6 Verwendete Analyse-Kits.....	28
Tabelle 7 Be- und Entladungsdaten der Cubitainer der Goldbrassenlarven.....	31
Tabelle 8 Übersicht der Anpassung der Durchflussraten in mL/min über den Versuchszeitraum anhand der Tank-Nr. und dem Alter der Larven (dph). ....	37
Tabelle 9 Übersicht der überprüften Zusammensetzung hinsichtlich der Trockenmasse, des prozentualen Aschegehaltes, des prozentualen Proteinanteils, des prozentualen Fettanteils und dem Energiegehalt in den in der Aufzucht verwendeten micro diets. ....	51
Tabelle 10 Übersicht der von Hersteller angegebenen Zusammensetzung hinsichtlich der Trockenmasse, des Aschegehaltes, des prozentualen Proteinanteils und des prozentualen Fettanteils in den in der Aufzucht verwendeten micro diets. ....	52
Tabelle 11 Pipettierlayout für die 96-Well Mikrotiterplatte für die Trypsin- Standardkurve und die Eichkurve mit MCA. ....	57
Tabelle 12 Beispiel für ein Pipettierlayout für die 96-Well Mikrotiterplatte für die Messung von Proben. ....	59
Tabelle 13 Übersicht über die gesamten Mortalitätsraten für alle Treatments. ....	61
Tabelle 14 Rangfolge der Treatments berechnet anhand eines Punktesystems in den Kategorien Mortalitätsrate, Länge, Gewicht und Trypsinaktivität.....	86

## **Zusammenfassung**

Die Wichtigkeit der Optimierung der Futterregime für Brutbetriebe spiegelt sich in zahlreichen Untersuchungen wider. Dabei ist vor allem die Kostensenkung bei gleichbleibender oder steigender Futterqualität im Fokus professioneller Brutbetriebe. Dadurch wächst das Interesse, die Phasen der Lebendfutterzugabe in Aufzuchtprotokollen zu verkürzen. Indes soll die Wachstumsgeschwindigkeit, die Gewichtszunahme und vor allem die Überlebensrate von Fischlarven bewahrt werden.

In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass Trypsin als Indikator für die Bewertung der Verdaulichkeit des Futters und des Ernährungszustands von Fischlarven geeignet ist. Deshalb wurde die Auswirkung einer verkürzten Artemienzugabe auf Goldbrassenlarven (*Sparus aurata*) anhand der individuellen tryptischen Enzymaktivität analysiert. Dabei wurde die Kurz- und Langzeitwirkung der Zugabe ebenfalls beim Wachstum und der Überlebensrate untersucht.

Die in dieser Studie verwendete Methode zur Bestimmung der Trypsinaktivität folgt der von Ueberschär (1988) beschriebenen hochempfindlichen Fluoreszenztechnik.

Die Goldbrassenlarven wurden in Gruppen mit verschiedenen Fütterungsregimen aufgeteilt: (1) Kontrollgruppe nach Industriestandard, (2) Co-Fütterung Copepoden mit micro diet als Erstfütterung und kurze Artemienzugabe („Kiss of Artemia“) nach der Beendigung der Copepodenverfütterung, (3) Co-Fütterung Rotatorien mit micro diet und (4) Co-Fütterung Copepoden mit micro diet.

Die Ergebnisse der Studie zeigen einen positiven Effekt auf die Trypsinaktivität von Goldbrassenlarven bei der Zugabe von Artemien. Dabei wurden keine erkennbaren Nachteile für die Trypsinaktivität bei einer verkürzten Artemienzugabe beobachtet. Außerdem konnte auch ein positiver Effekt auf die Überlebensrate durch die Verfütterung von Artemien in Kombination mit Copepoden und der GEMMA NEO micro diet nachgewiesen werden. Ein langfristiger Effekt der erhöhten Trypsinaktivität auf die Wachstums- und die Gewichtszunahme wurde nicht eindeutig nachgewiesen, konnte jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

Das beste Gesamtergebnis zeigte das Fütterungsregime 2: die Co-Fütterung von Copepoden mit micro diet und eine kurze Artemienzugabe.

## Einleitung

### 1. Einleitung

Seit mehr als 80 Jahren steigt die Nachfrage nach tierischem Protein, insbesondere an aquatischen Lebensmitteln. Der seit 1950 deutlich gestiegene Fischkonsum beruht zunächst auf der sich fast verdreifachten Bevölkerung und einem Anstieg des Pro-Kopfkonsums auf etwa 21 kg/Jahr an Fisch (Abbildung 1, (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019)).

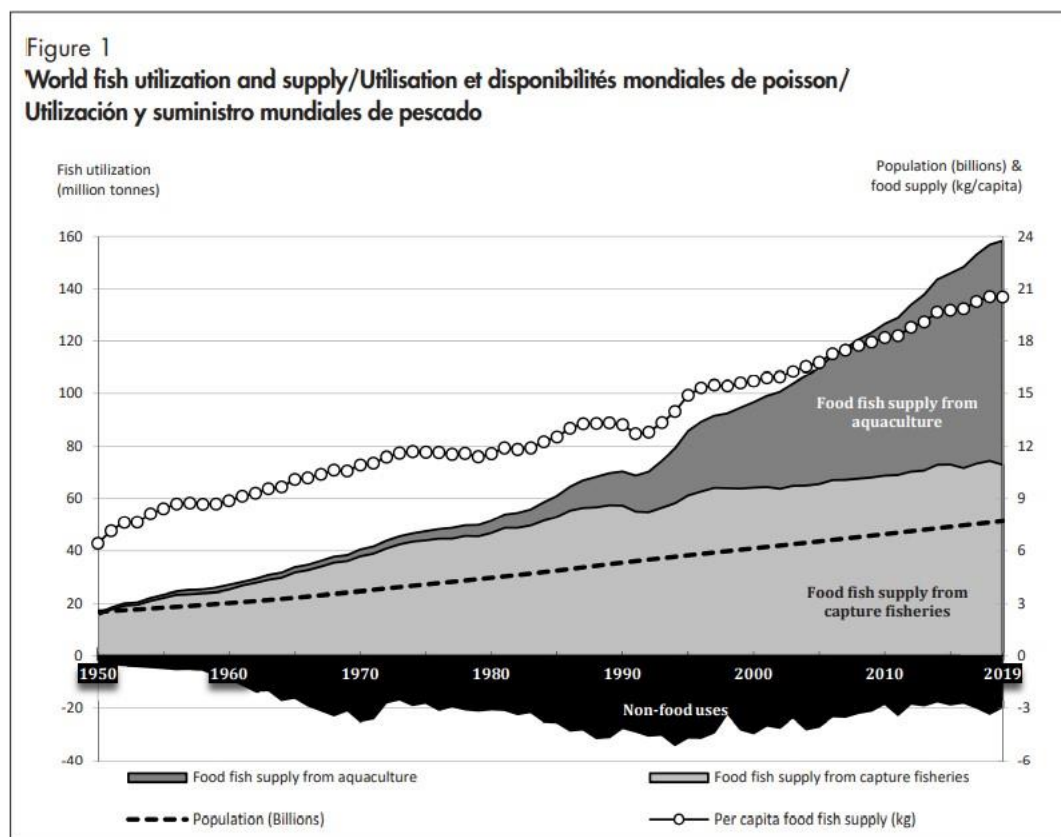


Abbildung 1 Entwicklung der Fischversorgung über die Fangfischerei und die Aquakultur weltweit, sowie Gegenüberstellung zur Weltbevölkerung mit Durchschnittlichem Pro-Kopfkonsum und der Verwendung von Fisch für Nicht-Lebensmittelanwendungen.

Dargestellt ist der Anstieg der Fischversorgung von 1950 bis zum Jahr 2019 und das Wachstum der Population in Milliarden im selben Zeitraum. In den 1950er Jahren wurde die Bevölkerung fast ausschließlich durch den Fischfang versorgt, nur der geringste Anteil an Fisch stammte aus der Aquakultur. Mit dem Wachstum der Bevölkerung und einer Zunahme an Pro-Kopfkonsum an Fisch, erhöhte sich auch die Fischversorgung über den traditionellen Fischfang. Doch da dieser nur eine allmähliche Steigerung zuließ, wurde die Aquakultur als Alternative ausgebaut, um den Bedarf an Fisch zu decken. Zusätzlich zur Versorgung der Bevölkerung, stieg auch die Verwendung von Fisch für Produkte, welche nicht für den Verzehr gedacht sind. Dies beinhaltet z.B. pharmazeutische oder kosmetische Anwendungen oder die Herstellung von Biokraftstoffen (Leal et al., 2016).

Der Anstieg des Fischkonsums in der Zukunft ist durch das kontinuierliche Wachstum der Bevölkerung und des Kopf-Konsums wahrscheinlich. Durch den traditionellen Fischfang kann der wachsende Bedarf inzwischen nicht mehr gedeckt werden, denn mehr als 35 % der kommerziell genutzten Fischbestände gelten als überfischt und 57 % als maximal genutzt. Im Mittelmeer und im Schwarzen Meer gelten dabei etwa

## Einleitung

63,4 % der Fischbestände als überfischt (*Überfischung: Bald drohen uns leere Meere*, 2022). Seit 2016 wurde die Aquakultur verstärkt als Alternative angesehen, um den Bedarf nach Fischerzeugnissen der Bevölkerung zu decken (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016) und entsprechend ausgebaut. Derzeit findet etwa 46 % der Gesamtfischproduktion in Aquakulturen statt (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020). Um die aquatischen Ökosysteme weiter zu entlasten und die steigende Nachfrage an Fisch zu decken, muss die Aquakulturindustrie wachsen und die Produktion steigen.

Ein Problem bei der Produktionssteigerung in der Aquakultur liegt jedoch in der Aufzucht von Satzfishen mariner Fischarten. Das Wachstum der Aquakulturindustrie erfordert die Bewältigung verschiedener Herausforderungen, um den Nachschub von Setzlingen in zuverlässiger Qualität und Quantität dauerhaft zu sichern. So gilt trotz zahlreicher Forschungsanstrengungen die hohe Sterblichkeitsrate während der Larvenproduktion noch immer als Engpass für die Aquakulturproduktion. Die hohe Sterblichkeitsrate hängt vermutlich mit dem im frühen Larvenstadium unzureichend entwickelten Verdauungstrakt und der geringen Verdauungsenzymkapazität zusammen (Tillner et al., 2013; Zambonino-Infante et al., 2008). Teilweise können die Nährstoffe des Erstfutters in den frühen Larvenstadien nicht effizient genug verdaut werden, wodurch die Nährstoffe für die Larve nicht verwertbar sind. Dies wirkt sich negativ auf die Überlebens- und Wachstumsraten aus. Die Zusammensetzung und Qualität des Erstfutters muss deshalb auf die Verdaulichkeit und Nutzbarkeit der darin enthaltenen Nährstoffe und auf die verdauungstechnischen Fähigkeiten der frühen Larvenstadien abgestimmt sein.

Das Wissen über die Ernährungsbedürfnisse von Fischlarven, die Entwicklungsphysiologie, ihre Verdauungskapazitäten und deren Auswirkungen auf die Formulierung von Mikrodiäten ist noch nicht vollständig bekannt (Hamre et al., 2013; Rønnestad et al., 2013). Dadurch gibt es noch immer zahlreiche Forschungsanstrengungen zur Weiterentwicklung des Wissens über die Eignung verschiedener Lebendfutter und Mikrodiäten, die sich entwickelnden Verdauungssysteme der Fischlarven und die sich mit dem Futter entwickelnden Enzyme.

## Einleitung

Um das Wissen zu diesem Thema zu erweitern, entstand die vorliegende Arbeit mit ihrer Fragestellung als Unterprojekt aus dem Projekt „Deutsche Bundesstiftung Umwelt - Marines Zooplankton als Grundlage einer nachhaltigen, ressourcenschonenden Fischfütterung“.

### **1.1 *Sparus aurata***

*Sparus aurata* (*S. aurata*), herkömmlich „Goldbrasse“ oder „Dorade“ genannt, ist eine wichtige Grundfischart, welche aufgrund ihrer euryhalinen und eurythermen Eigenschaften im Mittelmeer, dem Schwarzen Meer und in der Ostatlantik von Großbritannien bis Senegal heimisch ist (*Sparus aurata*, 2022). Dabei reichen die Lebensräume von marinem bis Brackwasser.

Das wichtigste Merkmal der Goldbrasse ist der ovale und seitlich abgeflachte Körper mit einem goldenen Querband, nach welchem der Fisch benannt wurde (*Fischlexikon: Goldbrasse, Dorade (Sparus aurata)*, o. J.). Adulte Tiere können eine Länge zwischen 25 – 35 cm (max. 70 cm) und ein Gewicht von 2,5 kg (max. 17 kg) erreichen (*Dorade (Goldbrasse)*, 2019).

Die Goldbrasse lebt bevorzugt auf Seegraswiesen und auf Sandböden, in der Regel bei einer Tiefe von bis zu 30 m. Ausgewachsene Arten können jedoch auch bei einer Tiefe von 150 m vorkommen (*Dorade (Goldbrasse)*, 2019). In frühen Lebensstadien werden jedoch küstennahe Lagunen und Ästuare bevorzugt. Die Larven dieser Art schlüpfen im offenen Wasser und wandern dann erst in die Küstenbereiche, wo sie vor Fressfeinden geschützt sind und ein besseres Futterangebot finden können (*Fischlexikon: Goldbrasse, Dorade (Sparus aurata)*, o. J.).

Die Goldbrasse wird seit jeher aufgrund ihres schmackhaften Fleisches und der wenigen Gräten als hochwertiger Speisefisch sehr geschätzt. Zusammen mit dem Europäischen Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*) ist es die wichtigste marine Aquakulturart im Mittelmeerraum. Schon im Römischen Reich wurde sie zum Beispiel in flachen Lagunen und speziell angelegten Meerwasserteichen gehalten. Erst jedoch seit den 1980er-Jahren werden Goldbrassen kommerziell in der Aquakultur vor allem an der Mittelmeerküste gezüchtet (*Dorade (Goldbrasse)*, 2019). Für die semi-intensive Aufzucht werden neben abgesperrten Lagunen häufig fest verankerte Netzgehege genutzt. Für die intensive Bewirtschaftung werden entweder landgestützte Kreislaufanlagen oder Offshore-Netzgehege genutzt (*Dorade (Goldbrasse)*, 2019).

## Einleitung

Die weltweite Gesamtproduktion der Goldbrasse ist von etwa 87.303 Tonnen im Jahr 2000 auf 258.754 Tonnen im Jahr 2019 gestiegen. Dabei führt derzeit die Türkei in der Weltproduktion mit einem Anteil von 38,54 %. Dem folgen Griechenland mit 21,43 % und Ägypten mit 13,87 % und mit zusammen etwa 15 % der Weltproduktion ergebend, folgen Tunesien, Spanien und Italien. Diese ergeben die sechs weltweit produktionsstärksten Länder (Compassion in Food Business, 2021).

### **1.2 Ernährung mariner Fischlarven**

Die Qualität und Verfügbarkeit der aufgenommenen Nahrung hat eine zentrale Bedeutung für die Gesundheit und das Überleben von Lebewesen. Dabei muss vor allem bei Fischlarven auf die bedarfsgerechte Qualität und Quantität der Nahrung geachtet werden. Larvenstadien der meisten Fischpopulationen in natürlichen Gewässern sind durch eine hohe Gesamtmortalität charakterisiert, die vor allem durch Nahrungsmangel und Räuberdruck zu erklären sind (Ueberschär, 1999). Um der hohen Mortalität durch Verhungern zu antizipieren, kommt bei kontrollierter Aufzucht der proteinreichen Diät große Bedeutung zu.

Die Gefahr der Mortalität durch Kannibalismus besteht grundsätzlich auch bei der Aufzucht von Fischlarven während der gesamten Lebensphase, wohingegen Nahrungsmangel als Sterblichkeitsursache mit fortschreitendem Entwicklungsgrad abnimmt. Für die Überlebensraten von Fischlarven in der Aquakultur ist deshalb das Angebot an geeignetem Futter von entscheidenderer Bedeutung. Dabei muss das Futter sowohl in der Nährstoffkomposition geeignet sein, als auch eine an das Lebensstadium der Larve angepasster Größe aufweisen. Deshalb werden große Anstrengungen unternommen, um adäquate und bedarfsgerechte Trockenmischfuttermittel für Fischlarven zu entwickeln. Lebendfuttermittel sind hinsichtlich der Attraktivität und nutritiven Qualität die natürlichste und hochwertigste Nahrungsquelle für Fischlarven, jedoch werden auch zunehmend mikropartikuläre Trockenmischfuttermittel sogenannte micro diets (MD) genutzt, da deren Verwendung in vielerlei Hinsicht deutlich effizienter ist als die aufwendige Aufzucht und Verabreichung von Lebendfutter.



## Einleitung

### 1.2.1 Lebendfutter

Die Fütterung mit Lebendfutter stellt die natürlichste Art der Fischlarven-Ernährung dar: Das Bewegungsmuster des Lebendfutters triggert das Fressverhalten bei den Larven und fördert die natürlichen Verhaltensweisen durch Auslebung des Jagdtriebs beim Verfolgen des Futters. Dabei kann die Larve je nach Art des Futters verschiedene lebensnotwendige Stoffe wie zum Beispiel Proteine, Kohlenhydrate, Fette, Mineralstoffe oder Vitamine aufnehmen und dies, im Gegensatz zu den Trockenfuttermitteln, im frischen Zustand. Außerdem kann durch das Verfüttern von Lebendfutter, welches vorher mit Zusatzstoffen wie Vitaminen oder Fettsäuren, wie Eicosapentaensäure (EPA) oder Docosahexaensäure (DHA) angereichert wurde, eine zusätzlich wachstumsförderliche Ernährung erzielt werden.

#### 1.2.1.1 *Brachionus plicatilis*

Eines der bekanntesten Fischnährtiere ist *Brachionus plicatilis* (*B. plicatilis*), welches zur Klasse der Rädertierchen (Rotatoria oder Rotifera) gehört. Die meisten Rädertierchenarten leben im Süßwasser, einige Arten leben im Brack- und Meerwasser.

*B. plicatilis*, eine der wenigen Arten die im Salzwasser leben, wird als Standard zur Aufzucht von Fischlarven verwendet, wenn Artemia-Nauplien zu groß für die Mundöffnung der Fischlarven sind (Meerwasser-Lexikon Team, 2012; Taxacher, 2011). Die Gesamtlänge weiblicher Rädertierchen kann 340 µm erreichen, und die Gesamtlänge von Männchen und Jungtieren beträgt etwa 150-200 µm (Taxacher, 2011).

*B. plicatilis* wird häufig verwendet, da diese Art leicht zu vermehren, einfach zu halten und euryhalin ist. Letzteres ermöglicht ihr Überleben bei Salinitäten von 1 ppt bis 97 ppt und somit eine große Reichweite an Einsatzmöglichkeiten als Futtertiere bei Fischen mit verschiedenen Salinitätsoptima. Es muss jedoch beachtet werden, dass diese Rädertierchenart nur eine Salinitätsschwankung von  $\pm 5$  ppt aushalten können und bei größeren Schwankungen innerhalb kurzer Zeit sterben (Taxacher, 2011).

## Einleitung

Obwohl *B. plicatilis* aufgrund seiner für die Larvenaufzucht geeigneten Eigenschaften bevorzugt verwendet wird, enthält diese Art von Natur aus eine ungenügende Menge an hochungesättigten Fettsäuren (highly unsaturated fatty acids, HUFA), spezifisch EPA und DHA. *B. plicatilis* muss deshalb mit geeigneten Zusatzstoffen angereichert werden, um den Nährwert zu steigern (Meerwasser-Lexikon Team, 2012; Rasdi & Qin, 2014).

### 1.2.1.2 *Acartia tonsa*

Neben Rädertierchen werden auch marine Ruderfußkrebse (Copepoda) bei der Aufzucht von juvenilen Fischen verwendet. Sie sind eine der häufigsten und wichtigsten Arten wirbelloser Meerestiere, die in vielen Meeres- und Süßwasserökosystemen das Bindeglied zwischen Primärproduzenten und Konsumenten bilden. Da sich Copepoden gemeinsam mit Fischlarven im Meer entwickelt haben, ist es wahrscheinlich, dass die Verwendung von Copepoden in der Aufzucht den Nährstoffbedarf der Fischlarven am besten deckt (Rasdi & Qin, 2014). Eine wichtige Copepodenart im Spektrum möglicher Nährtiere ist *Acartia tonsa* (*A. tonsa*), die zur Ordnung der Calanoide gehört (Chen & Hare, 2008).

Adulte Copepoden können eine Größe von 500 µm bis 1500 µm erreichen und sind damit teilweise mehr als doppelt so groß wie adulte *B. plicatilis* (G. Gonzales, 2013; Leandro et al., 2006). Auch rücken Copepoden aufgrund ihres besseren Nährwertes mehr in der Vordergrund von Fütterungsversuchen mit Larven: Die hohen Gehalte an den omega-3 Fettsäuren EPA und DHA und freien Aminosäuren (FAA) sind wichtige Faktoren, die Copepoden zum überlegenen Lebendfutter gegenüber Artemien und Rotatorien machen (Rasdi & Qin, 2014). Copepoden-Nauplien sind eine reichhaltige Quelle für FAA mit mehr als der doppelten Menge an FAA pro Gramm feuchter Biomasse im Vergleich zu Artemien (Rasdi & Qin, 2014).

Trotz technischer Fortschritte sind Copepoden-Nauplien noch immer schwer aufzuziehen und auf Vorrat zu produzieren, weshalb sie für einfache Aquakulturen zu kostenintensiv sind. Es sind weitere Verbesserungen erforderlich, um die große Nachfrage nach Copepoden in der Aquakulturindustrie zu befriedigen. In semi-extensiven Tankkulturen werden isolierte Copepodenpopulationen aus der natürlichen Umgebung direkt zur Fütterung von Fischlarven verwendet oder in Tanks gehalten, in denen die Phytoplanktonblüte durch die Zugabe von Nährstoffen zum Wasser angeregt wird. Semi-extensive Systeme sind wartungsarm und ermöglichen die

## Einleitung

Produktion großer Mengen von Copepoden, Eiern und Nauplien (Støttrup, 2006). Aufgrund des offenen Charakters der extensiven Kultur sind die angeimpften Copepoden jedoch anfällig für Infektionen oder Kontaminationen durch andere Copepodenarten, anderes Zooplankton und Parasiten oder Viren, die entweder die Copepoden infizieren oder sie als Zwischenwirte nutzen, um die Fischlarven infizieren (Drillet et al., 2011).

Die Dichte der Copepoden-Individuen ist für die Copepodenkultur ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Einige Copepoden reagieren viel empfindlicher auf hohe Dichten als andere Lebendfutterarten wie Rotatorien. Die Frage der Dichte ist von zentraler Bedeutung, da die Produktionskosten direkt mit der potenziellen Dichte der Copepodenkulturen zusammenhängen. Calanoide Copepoden gelten als schlechte Kandidaten für die Massenzucht, weil sie in hohen Dichten nicht gut überleben können.

*Apocyclops panamensis* (*A. panamensis*) ist ebenfalls eine Art der marinen Ruderfußkrebse (Copepoda), gehört jedoch zur Ordnung Cyclopodia. Diese Art hat eine ähnliche Größe wie Rotatorien und wird ebenfalls derzeit als Alternative zu Rotatorien, Artemien und calanoiden Copepodenarten bei der Larvenaufzucht erforscht.

### **1.2.1.3 *Artemia salina***

Das wichtigste und beliebteste Erstfutter bei der Fischlarvenaufzucht ist *Artemia salina* (*A. salina*) und die Nauplien dieser Art. *A. salina*, auch als Salinenkrebse oder Salzwasserkrebse bekannt, gehören zur Klasse der Krebstiere und Gattung der Artemia. Trotz der vergleichsweise großen Nauplien (erstes Larvenstadium), welche mit,  $\pm 430 \mu\text{m}$  größer als ausgewachsene *B. plicatilis* ( $340 \mu\text{m}$ ) sind, werden diese seit langem bei vielen Larvenaufzuchten eingesetzt (algova, 2017; Martini, 2002).

Artemien sind unspezifische Fresser, wodurch sie eine breitgefächerte Auswahl an Nährstoffen aufnehmen können. Die Beliebtheit von Artemien als Lebendfutter ist vor allem auf die einfache Handhabung zurückzuführen, da die gebrauchte Menge an Nauplien für eine Aufzucht innerhalb von 24 Stunden aus ruhenden Zysten schlüpfen kann. Die Zysten sind auf dem kommerziellen Markt erhältlich, können bei den richtigen Bedingungen über weite Strecken transportiert und über längere Zeiträume gelagert werden.

## Einleitung

Jedoch sind auch Artemien und ihre Nauplien defizitär an HUFAs und müssen mit weiteren Zusatzstoffen angereichert werden, um ihren Nährwert zu steigern (Martini, 2002). Außerdem kann ein potentieller Mangel an *Artemia*-Zysten die Produktion in den Aquakulturen beeinträchtigen und die nachhaltige Versorgung mit Setzlingen für die weitere Aufzucht gefährden.

Die natürliche Produktion an *Artemia*-nauplien weltweit beträgt durchschnittlich etwa 3000 t. Diese Menge an Nauplien wird bereits in der aktuellen Fischlarvenaufzucht verbraucht (*ProLarva*, 2015). Obwohl Lösungen für eine Produktionssteigerung gesucht werden, sind bisher die Probleme der Produktionsnachhaltigkeit noch nicht gelöst (Islam et al., 2019; Litvinenko et al., 2015). Daraus ergibt sich, dass ein weiteres Wachstum der marinen Fischproduktion nur möglich ist, wenn alternative Futtermittel, wie zum Beispiel mikropartikuläre Futtermittel, eingesetzt werden können. Es besteht ein strategischer Bedarf an einer Diversifizierung der Lebendfutterarten, um die starke Abhängigkeit von *Artemia*-Nauplien bei der Larvenaufzucht zu verringern (Rasdi & Qin, 2014).

In den meisten Brutbetrieben („Hatchery“/ „Hatcheries“) ist Lebendfutter für viele Aquakulturarten noch immer unverzichtbar (Carter, 2015). Jedoch erfordern die Produktion von Lebendfutter und Verfahren zur Verbesserung des Nährwerts Platz und Personalaufwand. Dadurch erhöhen sich die Komplexität und die Kosten der Produktion und damit insgesamt auch der Larvenaufzucht. Aus diesem Grund wird bereits seit längerer Zeit versucht die Verwendung von Lebendfutter zu reduzieren und durch mikropartikuläres Kunstfutter zu ersetzen.

### **1.2.2 micro diets**

Als micro diets (MD) werden künstliche Trockenfuttermittel bezeichnet, welche auf die verschiedenen diätetischen und biometrischen Anforderungen von Juvenilen und Fischlarven abgestimmt sind und das Lebendfutter ersetzen sollen. Diese kombinieren oftmals mehrere Zutaten, die zu sehr kleinen Partikeln gemahlen wurden und unterschiedliche Formen und Größen aufweisen können. Dabei sollen, je nach Art, Stadium und Ernährungsbedürfnissen, micro diets mit verschiedenen Rezepturen (in z.B. unterschiedlichen Vitaminkonzentrationen oder Aminosäuren) in der Fischlarvenaufzucht eingesetzt werden, um eine Alternative zur Aufzucht zum Lebendfutter zu bilden (Carter, 2015).

## Einleitung

Um erfolgreich zu sein, muss ein künstlich formuliertes Futter die Fischlarven zum Fressen anregen, klein genug für den Verzehr sein, verdaulich sein und lösliche, niedermolekulare Nährstoffe mit niedrigem Molekulargewicht enthalten. Außerdem darf das Futter im Wasser nicht instabil werden und sollte den Larven jederzeit zur Verfügung stehen, wobei die Verschmutzung des Beckens begrenzt werden soll (Carter, 2015; Kolkovski, 2013).

Die Vorteile einer Aufzucht ausschließlich durch MD sind vielfältig. Zum einen würde eine solche Aufzucht den Arbeitsaufwand verringern, wodurch etwa 70 % der Kosten für eine Aufzucht entfallen würden (R. Gonzales, 2022). Zum anderen würde das Risiko wegfallen, eine Lebendfutterkultur zum falschen Zeitpunkt zu verlieren, was auch den Verlust eines Larvenbatches bedeuten würde.

Für die Akzeptanz von MD durch die Larven spielt die Übergangsphase von einem lebenden Futtermittel zu MD („Weaning“) eine wichtige Rolle. Zwar hat in der Vergangenheit das frühe Weaning zu schlechtem Wachstum und minderwertigen Larven mit einem erhöhten Risiko von Skelettdeformationen geführt, jedoch konnte aufgrund von neuen Erkenntnissen bei der Formulierung von MD die Zeit vor Entwöhnung stark verkürzt werden. So können die hochentwickelten MD bereits bei der Öffnung des Mauls in die marine Fischzucht eingeführt werden. Dafür werden in der Regel „Co-Feeding“-Protokolle eingesetzt. Dabei werden gleichzeitig MD mit Lebendfutter verwendet, wodurch eine frühere und effizientere Umstellung möglich ist. Das Co-Feeding führt zu einem besseren Wachstum und einer geringeren Mortalitätsrate als die ausschließliche Fütterung mit Lebendfutter oder MD. Ein frühes Co-Feeding mit geeigneten MD kann die Versorgung der Larven mit allen essentiellen Nährstoffen (Mikro- und Makronährstoffe) verbessern und kann die Larven frühzeitig konditionieren, die MD leichter zu akzeptieren, wodurch negative Auswirkungen auf das spätere Wachstum nach der Entwöhnung vermieden werden (Kolkovski, 2013).

Jedoch konnte bisher die Verfütterung von MD, trotz beträchtlicher Fortschritte, nicht dieselben Wachstums- und Überlebensleistungen erreichen, wie die von Lebendfutter wie Rädertierchen und Artemia (Giebichenstein et al., 2021; Kolkovski et al., 2009; Rathore et al., 2016).

Einleitung

### **1.3 Verdauungsphysiologie mariner Fischlarven**

#### **1.3.1 Entwicklung des Verdauungstraktes bei *Sparus aurata***

Für die Berücksichtigung der verschiedenen Ernährungsbedürfnisse in den verschiedenen Lebensphasen und für ein Verständnis der Entwicklung dieser Bedürfnisse, ist es notwendig über grundlegendes Wissen zur Verdauungsphysiologie von Fischlarven zu verfügen.

Die meisten Meeresfisch, wie auch die Goldbrasse, gehören zu den altrizialen<sup>1</sup> Arten (Carter, 2015). Diese Larven haben beim Schlupf einen rudimentären Verdauungstrakt ohne einen Magen. Mit zunehmendem Alter entwickelt sich zunächst ein voll funktionsfähiger Darmtrakt und später dann in der Regel auch ein funktionstüchtiger Magen (Metamorphose) (Elbal et al., 2004).

Bei der Goldbrasse kann die Entwicklung in fünf verschiedene Lebensphasen unterteilt werden: die Phase direkt nach dem Schlupf (1 Tag nach dem Schlupf), das Prä-Larvenstadium (2 – 3 Tage nach dem Schlupf), das frühe Larvenstadium (4 – 7 Tage nach dem Schlupf), das Hauptlarvenstadium nach dem Dottersack (8 – 56 Tage nach dem Schlupf) und der Beginn der juvenilen Phase (60 – 69 Tage nach dem Schlupf) (Elbal et al., 2004). Dabei ist anzumerken, dass die Länge der Phasen temperaturabhängig ist und somit variieren kann. Für diese Arbeit sind nur die ersten vier Phasen von Bedeutung.

In der ersten Phase ist der Verdauungstrakt noch undifferenziert und die Larve ernährt sich ausschließlich über den Dottersack. Mit der Öffnung des Mauls und des Verdauungskanals, konkreter des Afters, und der Differenzierung des Verdauungstraktes in die Speiseröhre, den unvollständig ausgebildeten Magen und den Darm wird das Prä-Larvenstadium erreicht (Elbal et al., 2004).

---

<sup>1</sup> In der Biologie werden altriziale Arten als solche bezeichnet, bei denen die Jungen zum Zeitpunkt der Geburt unterentwickelt sind.

## Einleitung

Im frühen Larvenstadium existieren durch die Öffnung des Mauls kurzzeitig endogene und exogene Ernährung nebeneinander. Nach der ersten exogenen Fütterung beginnt sich bei Goldbrassenlarven eine Schleife im Verdauungstrakt zu bilden (Elbal et al., 2004). Die Verdauung geschieht nun ausschließlich über den Darm mithilfe von Verdauungsenzymen wie zum Beispiel Amylase, Lipase oder Trypsin. Dabei ist in dieser frühen Phase der Proteinverdauung im Darm das Trypsin das quantitativ bedeutendste Enzym. Am Ende dieser Phase wird der Dottersack aufgebraucht sein.

Im Hauptlarvenstadium ernährt sich die Larve nur noch exogen und der Dottersack wurde vollständig resorbiert. Das Bindegewebe und die Schleimhautfalten haben sich ausgebildet. Aufgrund einer vergleichsweise kurzen Darmschleife und dem Fehlen der Denaturierung der aufgenommenen Nahrung durch einen vollausgebildeten Magen ist die Verdauung jedoch wenig effizient. Eine erhebliche Steigerung der Effizienz bei der Verdauung erfolgt, wenn die Denaturierung im Magen und die Vorverdauung dort durch das Pepsin stattfindet. Die Entwicklung des Magens beginnt bei Goldbrassenlarven erst nach etwa 40 Tagen während der Frühmetamorphose (13,7 – 18,7 mm), wohingegen die Verdauung durch saure Proteolyse erst in der Spätmetamorphose (20,4 – 34,4 mm) mittels eines vollfunktionellen Magens stattfinden kann (Koumoundouros et al., 2008; Moyano et al., 1996).

### **1.3.2 Verdauungsenzym Trypsin**

Verdauungsenzyme sind Enzyme, welche die von einem Organismus aufgenommene Nahrung zerlegen bzw. die über die Nahrung aufgenommenen Biopolymere (Proteine, Fette, Kohlenhydrate...) in einfachere niedermolekulare Verbindungen aufspalten, um diese für den Stoffwechsel verwertbar zu machen.

Trypsin ist ein weit verbreitetes, primäres Verdauungsenzym und gehört zu den Serinproteasen, einer Unterfamilie der Endopeptidasen. Wie die meisten Enzyme ist Trypsin substratspezifisch und spaltet extrazellulär die durch die Nahrung aufgenommenen Proteine nach bestimmten Aminosäuresequenzen in der Eiweißkette. Konkreter heißt das, dass Trypsin die Hydrolyse der Peptidbindungen selektiv nach den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin katalysiert und somit eine Spaltung des Proteins nach diesen Aminosäuren erfolgt (Tamhart et al., 2022).

## Einleitung

Bei den Wirbeltieren wird das Trypsin als inaktive Vorstufe (Zymogene), Trypsinogen genannt, im exokrinen Teil des Pankreas synthetisiert. Das Trypsinogen wird erst im Darmlumen durch Enterokinase und anschließend durch einen autokatalytischen Vorgang durch Trypsin selbst aktiviert. Dies sorgt für eine Enzymaktivierungskaskade, bei der auch andere Zymogene, wie zum Beispiel Chymotrypsin, aktiviert werden, wodurch das Trypsin eine Schlüsselrolle einnimmt. Es wird angenommen, dass die Sekretierung des Trypsinogens in das Darmlumen hauptsächlich als Reaktion auf stimulative Faktoren, wie zum Beispiel die Nahrungsaufnahme (visuelle Reize) oder Stimulation der Dehnungsrezeptoren in Darm, erfolgt (Hjelmeland, 1995). Auch wurde eine hohe Korrelation zwischen tryptischer Aktivität und dem Hormon Cholecystokinin (CCK) im Darm von Heilbuttlarven gefunden, was darauf hindeutet, dass dieser Faktor ebenfalls zur Sekretierung des Trypsinogens beiträgt (Rojas-García & Rønnestad, 2002).

Das Hormon CCK ist als einer der wichtigsten Stimulatoren der Sekretion von Pankreasenzymen bekannt und spielt eine wichtige Rolle bei der Kontraktion der Gallenblase, der Darmperistaltik, der Verzögerung der Magenentleerung und der Sekretion von Pankreasenzymen bei Säugetieren und erwachsenen Fischen. Darüber hinaus wirkt es als Sättigungssignal im Fischgehirn (Tillner et al., 2013).

Bei Vorhandensein von Nährstoffen im Darm wird CCK von enteroendokrinen Zellen im Darmepithel in die Körperflüssigkeiten freigesetzt und wirkt auf Zielzellen in der Bauchspeicheldrüse, um die Sekretion von Zymogene in das Darmlumen auszulösen. Eine hohe Aktivität tryptischer Enzyme im Darm wirkt als negative Rückkopplungskontrolle für die Freisetzung von CCK, was auf einen Regelkreis zwischen diesen beiden Faktoren bei Säugetieren schließen lässt (Liddle, 2006). Ein ähnlicher Mechanismus wurde bisher bei erwachsenen Fischen beschrieben (Murashita et al., 2008).

Obwohl CCK-produzierende Zellen in verschiedenen Bereichen des Darms von Fischlarven mehrerer Fischarten gefunden wurden, ist über den Regulationsmechanismus zwischen CCK und Trypsin in diesen Larven wenig bekannt. Die Zahl der Studien, die sich mit der Wechselwirkung zwischen diesen beiden Faktoren in Fischlarven befassen, nimmt zu, und diese Studien legen nahe, dass CCK auch eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Pankreasenzymen in sich entwickelnden Fischlarven spielen könnte (Tillner et al., 2013).



## Einleitung

Da bei Fischlarven der Magen erst nach etwa 40 Tagen voll ausgebildet ist, der Darm sich jedoch vor der ersten exogenen Fütterung (nach ca. 4 Tagen), auszubilden beginnt, ist die Proteolyse mit Hilfe von Trypsin die erste Möglichkeit einer Verdauung. Dabei wirkt Trypsin in einer Schlüsselrolle zwischen der aufgenommenen Nahrung und dem Einbringen von Proteinmolekülen in das intrazelluläre System (Hjelmeland, 1995; Moyano et al., 1996). Trypsin zerlegt extrazellulär die Proteine in Peptide, welche anschließend im Darm in den Kreislauf eingeschleust und intrazellulär auf das Aminosäurelevel weiter verdaut werden. Die Aminosäuren können dann genutzt werden, um in der Proteinbiosynthese zu körpereigenem Protein zusammengebaut zu werden.

Aufgrund ihrer essentiellen Rolle bei Stoffwechselprozessen sind proteolytische Enzyme, insbesondere Trypsin, gute Indikatoren für die proteolytische Verdauungsenzymkapazität und den Ernährungszustand bei Fischen (Hjelmeland et al., 1984; Sieg et al., 1989; Ueberschär, 1993), denn die Enzymaktivität und die Menge der im Darm gefundenen Nahrungsorganismen der einzeln untersuchten Fischlarven stehen in einem linearen Zusammenhang. (Ueberschär, 1993)

Aus diesem Grund kann für Fischlarven die Trypsinaktivität als Indikator für die proteolytische Verdauungsenzymkapazität verwendet.

### **1.4 Zielsetzung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Effekt verschiedener Fütterungsregime, auf die proteolytische Verdauungsenzymkapazität von Goldbrassenlarven (*Sparus aurata*) anhand des Indikators Trypsin mit biochemischen Methoden zu bestimmen und zu quantifizieren. Dabei wird besonderes Augenmerk auf den Zusatz von Artemien in der Fütterung und die Auswirkung dessen gelegt.

Es wurde die Arbeitshypothese formuliert, dass auch eine nur kurzzeitige Zufütterung von *Artemia*-nauplien („Kiss of Artemia“) nach der Umstellung auf MD-Fütterung die Trypsinproduktion anregen kann.

Die auf dieser Hypothese beruhende Aufgabe war es, die Enzymaktivität von Goldbrassenlarven unter dem Einfluss verschiedener Futtermittel zu quantifizieren und anhand dessen sowie Wachstums- und Überlebensparametern den Einfluss Artemien in den jeweiligen Fütterungsregimen zu qualifizieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 1 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Tauchpumpe ACRunner 120 (Becken 1)	Aqua Medic GmbH
Tauchpumpe ACRunner 9.0 (Becken 2)	Aqua Medic GmbH
Oceanrunner OR2500	Aquq Medic GmbH
Kreiselpumpe unbekannte Modelnummer	D&H Pumpen & Motoren
Kreiselpumpe Modelnr. 20200825	Lowara
Sauerstoffkompressor MEDO Compressor (AIR) Modelnr. 30230540	MEDO
Oxyguard Sauerstoffmessgerät	Handy Polaris
Seewasser Refraktometer Modell Hi96822	HANNA Instruments Inc.
Digitalthermometer GMH 1170	Greisinger
pH-Meter-Set Modell GMH 5550	Greisinger
Petrischale ø 80 mm	Duroplan
Illuminometer PCE-174	PCE Instruments
45W-LED-Leuchten (HWDKC-LED-45W-4000K, 4400 lm)	ilox GmbH
Sonnenlichtsimulator und Dimmer (SLS-1 Sunlight Simulator)	ilox GmbH
Kühlsystem Titan 6000 Professional Modelnr. 50507	Aqua Medic GmbH
reefdoser evo 4	Aqua Medic GmbH
HFS-F Feeder	Nutrakol
Abschäumer	Aqua Medic GmbH
Heizstäbe Titanium Heater, Titan Aquarium Heizer, 100 W	Aqua Medic GmbH
Heizstäbe Titanium Heater, Titan Aquarium Heizer, 500 W	Aqua Medic GmbH
Temperatur Controller (T-Controller)	Aqua Medic GmbH
Stabmixer	Braun
Gefriertrockner Modell Alpha 1-2 Ldplus	Martin Christ
Ultra-Mikrowaage (Sartorius Cubas™ MSA2.7s-000-Dm)	Sartorius
Elektronische Mikrowaage (Sartorius CPA-Modell 2245)	Sartorius
Mirkoskop CKX41	Olympus
Mikroskop M80	Leica
Notfallleuchte Teclight Pocket Plus	Gambit® Tools
UV-Sterilisator Helix Max UV 55W	Aqua Medic GmbH
Uv-Sterilisator UXP TW 900	UMEX
Sandfilter Christall 500	Behncke
Ozonisator Modell S 100	Sander
Fluoreszenzphotometer „infinite M200“	Tecan
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	ThermoFischer Scientific
Mikropistill Art. Nr. 0030-120.973	Eppendorf

## Material und Methoden

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Universal Filtervlies „SymecMicro“	JBL
Jodfreies Meerwasser	Aqua Medic GmbH
Probenbecher mit Deckel mit Fassungsvermögen a 100 mL	Careliv Produkte OHG
Verschlussfolie	Parafilm
96-Well Mikrotiterplatte „MicroWell™“, Schwarz, PS	Nunc™

### 2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
TRIS: Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan Art. Nr. 108382	Merck
Calciumchlorid-Dihydrat: CaCl <sub>2</sub> * H <sub>2</sub> O Art. Nr. 102382	Merck
Salzsäure (37 %): HCL Art. Nr. X942.1	Carl Roth GmbH
N $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginin-4-Methylcoumarinyl-7-Amid (BZ-Arg-MCA * HCl) Art. Nr. I-1070	Bachem
Fluorophor 4-Methylcoumarinyl-7-Amid (MCA) Art. Nr. Q-1025	Bachem
Trypsin 1:250 aus Schweinepankreas Art. Nr. 37292	Serva
Rinderserum-Albumin (BSA) Art. Nr. 11930	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO), C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Serva
Destilliertes Wasser	Millipore-Anlage

## Material und Methoden

### 2.1.4 Microalgen und micro diets

Tabelle 4 Verwendete Microalgen und micro diets

Microalgen und micro diets	Hersteller	Verwendung
<i>Nannochloropsis Salina</i> Konzentrat	BlueBiotech Būsum	Green Water technique
<i>GEMMA NEO for sea bream</i>	Skretting	Verfütterung

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 5 Verwendete Puffer und Lösungen und ihre Ansetzung

---

#### Trypsinanalyse

---

##### TRIS-HCL-Puffer (0,1 M)

0,1 M TRIS: 12,114 g

0,02 M Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): 2,9404 g

~ 6 mL HCL (37 %) zur pH Anpassung auf einen Wert von pH = 8

- Auffüllen mit dest. Wasser auf 1000 mL
- 

##### Substratlösung (0,2 mM), verwendetes Tagesvolumen 25ml

2,36 mg Substrat (BZ-Arg-AMC \* HCl) in 24,875 mL TRIS-Puffer + 0,125 mL

Dimethylsulfoxid (DMSO)

- Substrat und 0,125 mL DMSO vortexen bis das Substrat sich vollständig aufgelöst hat
- Mit TRIS-Puffer auf 1 mL auffüllen und vortexen
- Reaktionsgefäß 9x mit 1 ml Puffer spülen und in einen 25-ml-Messkolben überführen
- mit Puffer auf 25 ml auffüllen, mit Parafilm verschließen und bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahren

### 2.1.6 Kits

Tabelle 6 Verwendete Analyse-Kits

Kit	Hersteller
Ammonium-Test-Kit MColorTest™	Merck / Sigma-Aldrich
Nitrit- Test-Kit MColorTest™	Merck / Sigma-Aldrich

### 2.2 Hälterung<sup>2</sup>

#### 2.2.1 Aufbau des Larvenmoduls

Die Aufzucht der Goldbrassenlarven wurde beim Fraunhofer Institut für Individualisierte und Zellbasierte Medizintechnik in der Außenstelle Büsum durchgeführt. Für die Aufzucht wurde ein speziell dafür entwickeltes Versuchsmodul verwendet. Das Forschungsmodul besteht aus zwei separaten voneinander unabhängigen, halbgeschlossenen Einheiten mit teilweiser Kreislaufückführung (siehe Abbildung 2). Jede dieser Einheiten besteht aus jeweils einem großen Außentank (ca. 6000 L Wasservolumen) mit jeweils 12 konisch zulaufenden Tanks (ca. 65 L Wasservolumen) für die Larvenaufzucht. Sowohl Außen- wie Innenbecken bestehen aus Glasfaser-verstärktem Kunststoff. Das Modul wurde durch ein separates, lichtdichtes Zelt von der restlichen Forschungshalle abgetrennt. Durch diese Maßnahme wurde sichergestellt, dass die Aufzucht vor Außeneinwirkungen aus Forschungsanlagen in derselben Halle geschützt ist. Auf diese Weise war es ebenfalls möglich für die Larven ein von der allgemeinen Hallenbeleuchtung unabhängiges Lichtregime aufzustellen.

Für die Larvenaufzucht wurde Wasser aus der Nordsee verwendet. Dieses wurde über einen Sandfilter, einen UV-Sterilisator und einen Ozonisator in einen Wasserspeicher geführt, in dem es anschließend von Ozonrückständen via Belüftung befreit wurde.

Der große Außentank dient der Gewährleistung der Gleichbehandlung aller Tanks. Er soll die abiotischen Bedingungen, insbesondere die Temperatur, den Sauerstoff- und Stickstoffgehalt, in allen Tanks stabil halten. Dafür zirkuliert das Wasser aus den Außenbecken kontinuierlich durch das Aufzuchtssystem. Um die Partikel- bzw. Bakterienbelastung zu reduzieren, wird das Wasser mittels einer Kreiselpumpe jeweils durch einen externen Filter (Porenweite: 10 µm, 50 µm und 100 µm) gepumpt und von einer UV-Lampe bestrahlt. Die Porenweite des externen Filters wird im Laufe des Versuches der erwarteten Verschmutzungsart angepasst. Anschließend läuft das Wasser durch ein Kühlsystem, bevor es wieder in das Außenbecken geleitet wird.

---

<sup>2</sup> Die Einrichtung zur Aufzucht von Fischlarven

## Material und Methoden

Für das Außenbecken 1 wird eine Pumpe von D&H Pumpen & Motoren verwendet. Für das Außenbecken 2 wird eine Pumpe von Lowara verwendet. Beide Pumpen liefern dieselbe Pumpleistung.

Ein- und Auslass des Reinigungs- und Kühlsystems ist jeweils an den gegenüberliegenden Seiten der Becken angebracht, um eine gleichmäßige Durchmischung des Wassers zu gewährleisten. Im Außenbecken wird das Wasser anschließend über Luftausströmer mit technischem Sauerstoff angereichert.

Mittels einer Tauchpumpe wird das Wasser vom Außenbecken über ein Rohrsystem in die Aufzucht tanks gepumpt. Dies dient der Versorgung der Aufzucht tanks mit sauerstoffhaltigem, akklimatisiertem Wasser. Der Wasserrückfluss wird über ein zentrales Standrohrsystem ermöglicht. Die Standrohre befinden sich in der Mitte des jeweiligen Aufzucht tanks und sind mit einer Gaze umspannt, dessen Maschengröße der Larvengröße angepasst ist. Die Gaze verhindert das Ausschwemmen der Larven in das Außenbecken.

Die Zeit für einen vollständigen Austausch des Wassers, ist vom Durchfluss im jeweiligen Tank abhängig. Dieser wird individuell für jeden Tank mittels eines Kugelhahns eingestellt. Der Durchfluss betrug zu Beginn des Versuches 3,48 – 4,68 L/h und wurde gemäß des steigenden Sauerstoffbedarfes und dem Larvenalter erhöht.

Durch die Einleitung von frischem Wasser in die Aufzucht tanks entsteht eine Kreisströmung. Diese sorgt für eine Durchmischung des sauerstoffreichen mit dem sauerstoffarmen Wasser im Tank. Zusätzlich wird über einen Schlauch Sauerstoff direkt in das Wasser der Aufzucht tanks eingeleitet. Diese Belüftung sorgt zusätzlich für einen Auftrieb, welcher das Absinken von Larven in frühen Stadien verhindert. Auch wird verhindert, dass Futterpartikel sich frühzeitig auf dem Boden absetzen und so den Larven länger zur Verfügung stehen.

Das rückfließende Aufzucht wasser enthält organische Verunreinigungen wie Ausscheidungen, Inhaltsstoffe des nicht aufgenommenen Futters (Proteine, Lipide, Aminosäuren oder Lebendfutter selbst) oder Überreste verstorbener Larven. Zur Entfernung dieser organischen Abfallstoffe wurden zusätzlich Außenabschäumer zur Wasseraufbereitung an den Außenbecken eingesetzt. Diese wurden durch eine Tauchpumpe betrieben.

## Material und Methoden

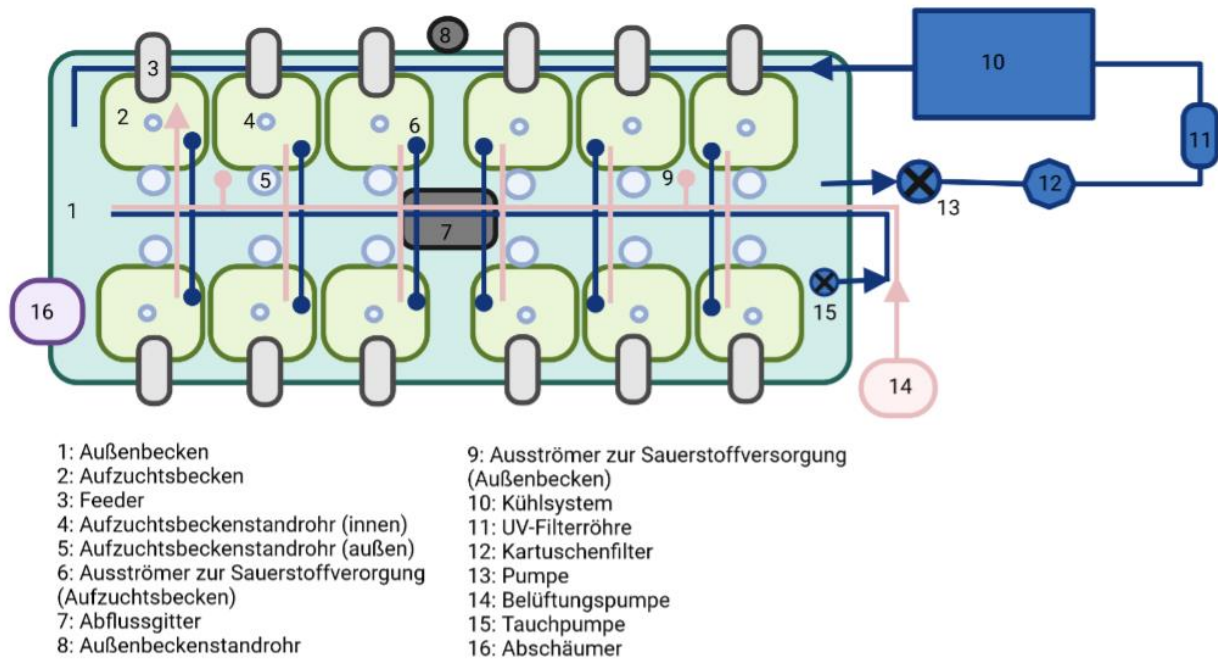


Abbildung 2 Vereinfachte Darstellung des technischen Aufbaus eines Außenbeckens des Larvenmoduls als Ansicht von oben.

Das Modul besteht aus zwei identisch aufgebauten, voneinander unabhängigen Einheiten, welche Spiegelverkehrt zueinander aufgestellt sind. Die Darstellung bildet die rechte Einheit vom Eingang zum Modul ab. Die Einheit enthält die Becken 1 bis 12, gezählt von oben links nach unten rechts. Die einzelnen Komponenten sind durchnummeriert mit jeweiligem Verweis in der Legende. Die Darstellung wurde von Diana Mikhaylovskaya in Microsoft Paint erstellt.

Eine fotografische Darstellung ist in 8.1 (Abbildung 38) zu finden.

### 2.2.2 Versuchsablauf der Larvenaufzucht (*Sparus aurata*)

Die Goldbrassenlarven stammen aus einer kommerziellen französischen Aufzucht („France Turbot“) und kamen im Alter von 1 Tag nach dem Schlupf an (days post hatching, dph). Die Larven befanden sich in zwei separaten Transportboxen (Cubitainer), welche mit Wasser und reinem Sauerstoff gefüllt waren. Die Be- und Entladungsdaten sind in Tabelle 7 zu finden.

Tabelle 7 Be- und Entladungsdaten der Cubitainer der Goldbrassenlarven

	Beladen	Entladen	
		Cubitainer 1	Cubitainer 2
Temperatur in °C	17	15,9	15,2
Salinität	33	35	35
	pH 7	O <sub>2</sub> 160%	O <sub>2</sub> 157%

## Material und Methoden

Die Larvenaufzucht wurde bei einem Alter von 56 Tagen nach dem Schlupf beendet. Es wurden bei der Ankunft mehrere Larvenunterproben entnommen und die sich in der Probe befindlichen Larven von *S. aurata* gezählt und gemittelt. Das Ziel der Ermittlung der ungefähren Anzahl der sich im Probenbehälter befindlichen Larven ist eine Abweichung der anfänglichen Individuenzahl zwischen den Tanks möglichst gering zu halten. Die Larven wurden möglichst gleichmäßig auf die 24 Tanks verteilt, sodass jeder Tank ca. 4500 Larven enthielt. Die anfängliche Dichte betrug 75 Larven/L.

Das verwendete Nordseewasser (Salinität von 22 – 27 ppt) wurde mittels jodfreiem Meersalz auf die Ankunftssalinität der Larven angepasst und betrug für die Aufzucht 37 ppt. Die Temperatur wurde ebenfalls auf die Herkunftsbedingungen von etwa 15 °C angepasst. Dies ist wichtig, da sonst die Osmoregulation der Larven sehr viel Energie verbrauchen würde und die Larven dadurch eine geringere Überlebenschance haben.

Trotz des Versuches alle Tanks gleich zu besetzen, gab es geringe Unterschiede, welche visuell evaluiert wurden. Die Unterschiede wurden bei der Verteilung der Fütterungsansätze berücksichtigt. Die Gruppen mit den verschiedenen Fütterungsansätze wurden über beide Außenbecken in die Tanks zufällig verteilt, wobei sichergestellt wurde, dass jeder Fütterungsansatz in beiden Einheiten zwei Mal vorkam. Die Gruppen waren den verschiedenen Fütterungstreatments des Fütterungsregimes zugeordnet und wurden entsprechend ihrer Zugehörigkeit markiert. Dies ist in der Abbildung 3 veranschaulicht.

Bis einschließlich 3 dph wurden die Larven unter Lichtausschluss in den Tanks gehalten. Jeder Außentank wurde mit acht 45W-LED-Leuchten beleuchtet, die von einem separaten, programmierbaren Sonnenlichtsimulator und Dimmer gesteuert wurden. Das Lichtregime ist in Abschnitt 2.2.3 näher beschrieben.

Vom Start des Lichtregimes bis Tag 21 dph wurde morgens in die einzelnen Tanks 2 mL eines Konzentrates der Microalge *Nannochloropsis salina* (12.000.000.000 Zellen/mL) in 50 mL Salzwasser verdünnt hinzugegeben, um für ein trübes grünes Wasser zu sorgen. Dieses soll die lichtempfindlichen Larven vor dem direkt einwirkenden Licht schützen und wird als „Green Water technique“ bezeichnet.



## Material und Methoden

Zusätzlich soll es helfen eine gesunde Bakterienflora zu etablieren und die Futteraufnahme durch Kontrastierung der Futtermittel zu erleichtern (Skiftesvik et al., 2003). Es wurden etwa 4 mL der Microalgenkonzentration in 100 mL Salzwasser verdünnt in die Außenbecken hinzugegeben, um trotz des Wasseraustausches eine Trübung in den Aufzuchtbecken zu gewährleisten.



Abbildung 3 Veranschaulichung der Aufzuchtankverteilung in die einzelnen Futtergruppen im Larvenmodul.

Die Zahl in der Mitte gibt die Tanknummer an. Die Futtergruppen (Treatments) sind unten aufgelistet und farblich codiert und geben direkte Auskunft darüber, welche Tanks in einer Futtergruppe zusammengehören. Der Rahmen gibt Auskunft darüber, welche Tanks zu einer Einheit gehören. Alle Versuchsgruppen wurden Quadruplikaten durchgeführt. Die Beprobung wurde von zwei Personen bei gleichbleibender Reihenfolge durchgeführt. Die Beprobungswege sind als grüne und orange Pfeile dargestellt. Die Startpunkte der Beprobungswege bilden die Tanks 1 und 12.

### 2.2.3 Überwachung und Dokumentation der Wasserparameter

Die Überwachung der Wasserparameter Temperatur, Sauerstoff, Salinität, pH-Wert und Ammonium- und Nitritgehalt erfolgte über den gesamten Versuchszeitraum täglich und wurde protokolliert. Aus diesen Daten wurde ermittelt, ob ein Eingriff in das System notwendig war.

Die Temperatur und Sauerstoffkonzentration wurden automatisiert gesteuert, aber zusätzlich manuell im Außenbecken überprüft. Dies geschah mittels eines Sauerstoffmessgerätes, eines Digitalthermometers und Analyse-Kits für den Ammonium- und Nitritgehalt.

Die folgenden Abbildungen (Abbildung 4 - Abbildung 8) stellen die über den gesamten Versuchszeitraum gemessenen Wasserparameter in beiden Außenbecken dar.

## Material und Methoden

Die Temperaturen in den Außenbecken wurden über den Versuchszeitraum so eingestellt, dass die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von Skelettdeformationen durch den Einfluss der Wassertemperatur möglichst gering gehalten wurde. Dabei ist eine Temperatur von 16 °C begünstigend für den Transport, jedoch ist die Prävalenz einer Schwanzflossendeformation größer (Georgakopoulou et al., 2010). Zudem führt ein starker Temperatursprung bei den Larven zu Stress und kann zu einer erhöhten Mortalitätsrate führen.

Eine Erhöhung von etwa 2 °C wurde als geeigneter Mittelweg zwischen Anpassung an die Ankunftstemperatur und Anpassung zu einer geeigneten Aufzuchttemperatur verwendet. So wurde die Temperatur zu Beginn des Versuches in den Außenbecken auf 17,5 – 18,0 °C eingestellt und in einem Zeitraum von 2 – 8 dph auf die optimale Aufzuchttemperatur angehoben.

Geeignete Aufzuchttemperaturen für den Zeitraum nach der ersten exogenen Futteraufnahme bis zur Metamorphose liegen zwischen 19 °C und 22 °C. Dies schließt den Zeitraum vom 4 dph bis etwa 60 dph ein. An dieser Stelle wird von „geeigneten“ Aufzuchttemperaturen gesprochen statt von „optimalen“, da bei verschiedenen Temperaturen verschiedene Deformationen der Schwanz- und Rückenflosse auftreten können. Bei der im Versuch angestrebten Temperatur zeigte sich zwar eine erhöhte Häufigkeit von Deformationen der Rückenflosse, jedoch eine geringere Tendenz zu Schwanzflossendeformationen (Georgakopoulou et al., 2010). Außerdem zeigte sich eine höhere Wachstumsrate mit zunehmender Temperatur bis 22 °C (Georgakopoulou et al., 2010). Für einen Kompromiss zwischen Verringerung der Rückenflossendeformationen, Aufrechterhaltung der Vorteile einer höheren Temperatur und Pufferung der Temperatur zwischen den Grenzen, wurde für die erste Hälfte des Versuches (4 – 30 dph) eine Temperatur von 20 °C angesteuert. Ab 31 dph wurde eine langsame Erhöhung auf 21 °C angestrebt. Der tatsächliche Temperaturverlauf ist in Abbildung 4 veranschaulicht und im Folgenden beschrieben.

Die Temperatur lag in den ersten 30 Tagen durchschnittlich bei etwa 19,5 °C ± 0,8 °C im ersten Becken und bei 19,6 °C ± 0,9 °C im Zweiten. Im übrigen Verlauf schwankte die Temperatur zwischen 20,0 °C und 21,1 °C bei angestrebter Temperatur von 21 °C und lag durchschnittlich bei 20,6 °C ± 0,2 °C bzw. 20,7 °C ± 0,3 °C in beiden Becken.

## Material und Methoden

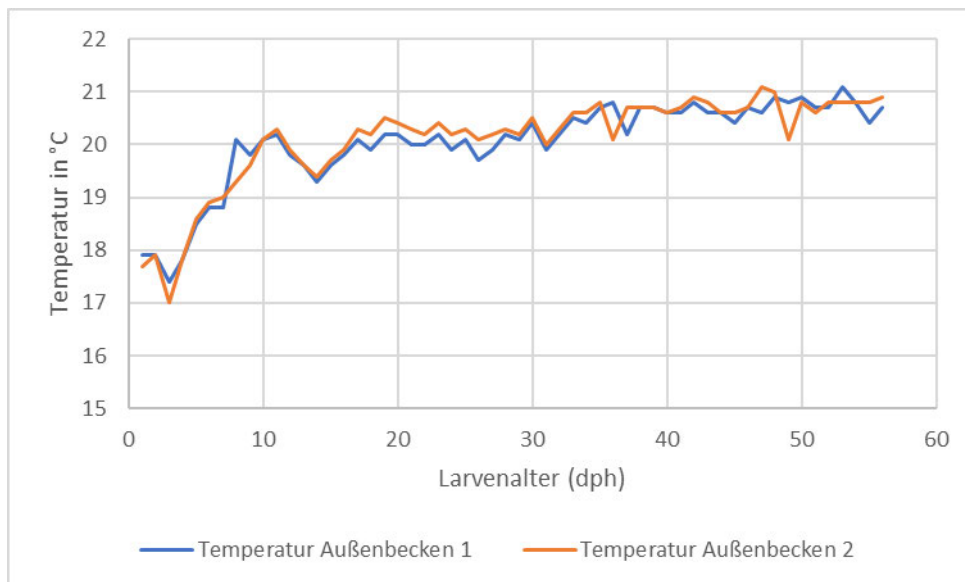


Abbildung 4 Darstellung des Temperaturverlaufs in beiden Außenbecken über den gesamten Versuchszeitraum.

Die Temperatur in beiden Außenbecken ist über den gesamten Zeitraum vergleichbar und weichen nur geringfügig voneinander ab. Die niedrige Anfangstemperatur von 17,5 – 18 °C dient der langsamen Anpassung der Larven an die Lieferbedingungen (15,9 °C und 15,2 °C) und später an die optimale Aufzuchttemperatur. Das langsame Vorgehen dient der Vermeidung von Stress für die Larven.

Zusätzlich zur Sauerstoffmessung im Außenbecken, wurde täglich morgens vor der ersten Fütterung der Sauerstoffgehalt der einzelnen Tanks gemessen und dokumentiert (Abbildung 5). Ab 17 dph wurde der Sauerstoffgehalt auch am Nachmittag überprüft. Die Überprüfungen dienten unter anderem der Überwachung des Sauerstoffs, um einem Absinken in den einzelnen Becken entgegenzuwirken und waren damit die Grundlage für die Anpassung des Wasserdurchflusses durch die Versuchstanks, um einen adäquaten Sauerstoffgehalt für die Fischlarven sicherzustellen.

Während der ersten 30 Versuchstage betrug die durchschnittliche Sauerstoffsättigung in Außenbecken 1  $101,5 \% \pm 0,8 \%$  (entspricht einer Sauerstoffkonzentration von  $7,8 \text{ mg/L} \pm 0,32 \text{ mg/L}$ ) und in Außenbecken 2  $101,7 \% \pm 1,1 \%$  ( $7,8 \text{ mg/L} \pm 0,32 \text{ mg/L}$ ). Ab 31 dph wurde aufgrund einer höheren Sauerstoffzehrung durch einen Anstieg organischer Reststoffe in den Aufzuchtstanks (im wesentlichen nicht gefressene MD) dem Außenbecken technischer Sauerstoff beigefügt. Dies geschah, um einen adäquaten Sauerstoffgehalt in den Becken zu gewährleisten, ohne durch die Erhöhung der Durchflussrate eine zu starke Strömung für die Larven zu erzeugen.

## Material und Methoden

Die durchschnittliche Sauerstoffsättigung bis zum letzten Versuchstag betrug  $111 \% \pm 8,7 \%$  ( $8,6 \text{ mg/L} \pm 0,6 \text{ mg/L}$ ) in Versuchsbecken 1 und  $110 \% \pm 8,3 \%$  ( $8,6 \text{ mg/L} \pm 0,6 \text{ mg/L}$ ) in Versuchsbecken 2.

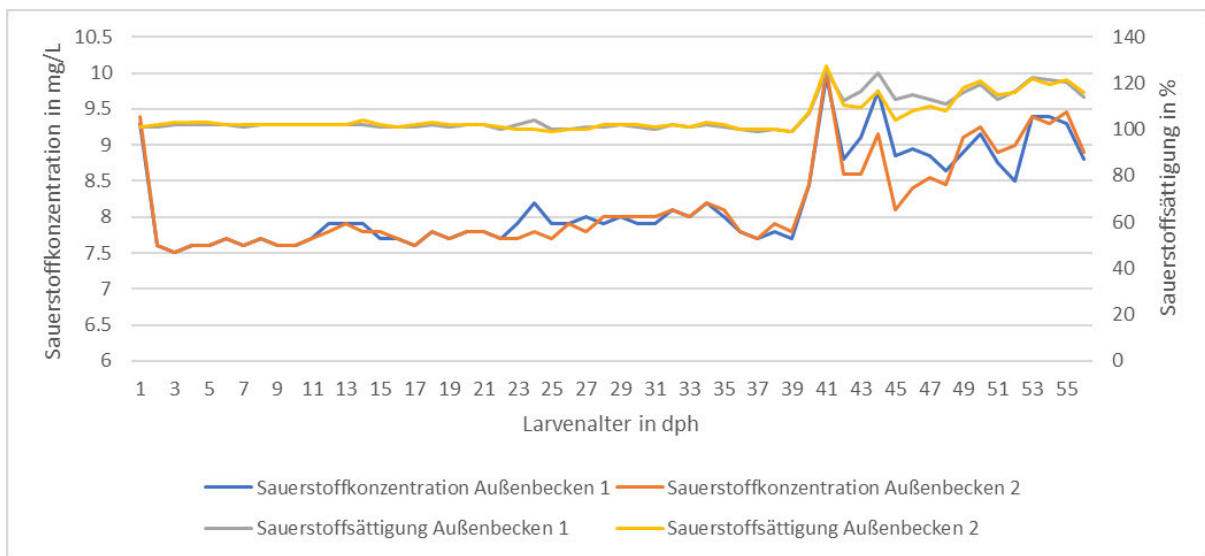


Abbildung 5 Aufzeichnung der während der Versuchszeit gemessenen Sauerstoffkonzentration und -sättigung beider Außenbecken.

Während der ersten 40 Tage war die Sauerstoffsättigung in beiden Becken ähnlich. Ab 41 dph wurden erstmals größere Differenzen zwischen den Werten beobachtet, welche durch die manuelle Zugabe des synthetischen Sauerstoffs entstanden sind. Auch bei der Sauerstoffkonzentration zeigt sich zwischen den Außenbecken ein ähnlicher Verlauf: Während der ersten 40 Tage sind beide Konzentrationen vergleichbar, weichen jedoch ab der Zugabe des synthetischen Sauerstoffs stärker voneinander ab.

Der Durchfluss wurde manuell durch die Justierung der oben beschriebenen Kugelhähne angepasst, um zunächst für einen höheren Wasseraustausch zu sorgen. Im späteren Verlauf wurde der Durchlauf erhöht, um eine Sauerstoffsättigung von mindestens 70 % einzuhalten.

## Material und Methoden

Für eine gleichmäßige Wasserzirkulation und um einen gleichbleibenden Sauerstoffgehalt in den Tanks zu gewährleisten, wurde in den einzelnen Tanks an 1 dph ein Durchfluss zwischen 58 mL/min und 76 mL/min eingestellt. Der Durchfluss wurde gemäß der Tabelle 8 erhöht. Gegen Ende der Versuche betrug der Durchfluss 1000 – 1090 mL/min.

*Tabelle 8 Übersicht der Anpassung der Durchflussraten in mL/min über den Versuchszeitraum anhand der Tank-Nr. und dem Alter der Larven (dph).*

*Bei den Tanks Nr. 3, 5, 13 und 22 wurde ab 8 dph keine Anpassungen mehr vorgenommen da diese Tanks wegen hoher Sterblichkeit durch zu große Futterorganismen eine hohe Sterblichkeit gezeigt haben und damit aus dem weiteren Versuchsablauf ausgeschlossen worden sind.*

Tank Nr. Alter (dph)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	60	68	68	64	72	70	68	60	58	70	62	60	66	64	76	72	64	62	58	58	72	60	58	70
5	138	142	240	134	240	144	114	154	138	134	122	148	220	122	154	138	158	150	138	132	130	250	158	154
8	184	192	/	210	/	220	210	194	180	210	202	204	/	180	184	220	206	200	208	182	190	/	210	210
14	380	400	/	370	/	375	350	360	370	390	380	370	/	370	380	360	350	350	390	380	400	/	350	390
18	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	380	/	/	/	/	/	/	/
20	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	400	/	/	/	/	/	/	/	/
21	580	610	/	620	/	560	630	650	580	600	610	600	/	640	580	590	590	620	590	620	570	/	650	560
27	800	750	/	750	/	760	800	790	770	800	750	800	/	790	760	770	790	800	750	750	760	/	780	750
37	1100	1070	/	1100	/	1050	1080	1000	1100	1040	1080	1080	/	1050	1100	1020	1040	1010	1070	1090	1100	/	1000	1010

Die Tanks 16 und 17 erhielten an 18 und 20 dph zusätzliche Anpassungen des Durchflusses. Bei Tank 17 wurde an 14 dph der Durchfluss auf 350 mL/min eingestellt. Aufgrund eines geringen Sauerstoffgehaltes an 18 dph, wurde jedoch festgestellt, dass der Kugelhahn des Tankes zuge dreht war und kein Wasseraustausch stattfand. Deshalb wurde an 18 dph in Tank 17 der Durchfluss neu eingestellt. Bei Tank 16 wurde an 20 dph festgestellt, dass der eingestellte Durchfluss nicht genügte, um den hohen Sauerstoffverbrauch auszugleichen. Aufgrund des hohen Sauerstoffverbrauchs im Tank musste die Geschwindigkeit des Wasserwechsels erhöht werden, sodass der Durchfluss schon früher angepasst werden musste.

## Material und Methoden

Angepasst an die Ankunftssalinität betrug die Salinität in beiden Außenbecken an 1 dph 37 ppt. Die Salinität wurde mittels eines digitalen Seewasser Refraktometers gemessen. In den ersten 30 Tagen der Aufzucht wurde eine Absenkung der Salinität bei beiden Becken von 37 ppt auf etwa 28 ppt durchgeführt. In den darauf folgenden Tagen pendelte die Salinität zwischen 26 ppt und 27 ppt (Abbildung 6).

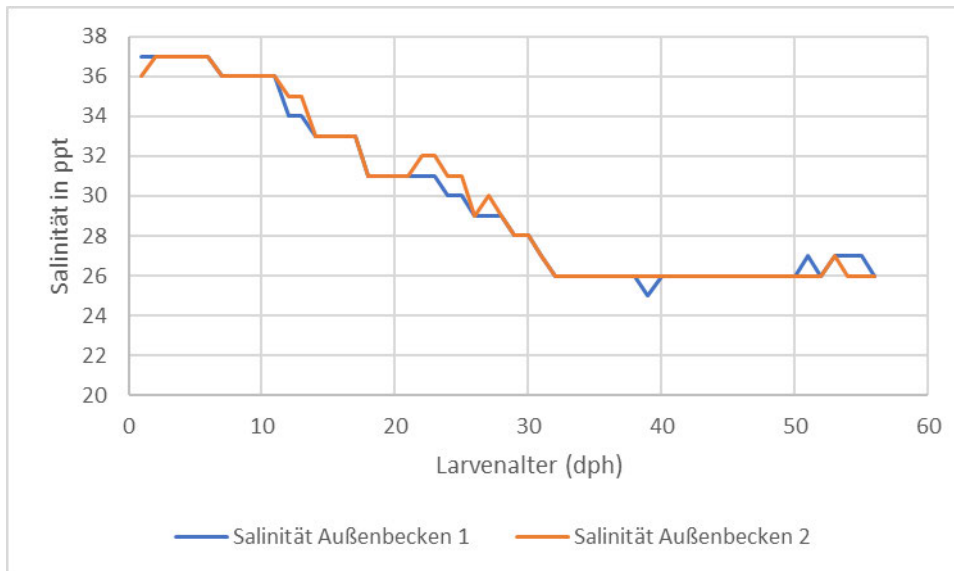


Abbildung 6 Aufzeichnung der während der Versuchszeit gemessenen Salinitäten beider Außenbecken.

Die gemessenen Salinitäten in beiden Außenbecken weisen nur geringe Schwankungen zueinander auf. Die erhöhte Anfangssalinität stammt, wie bei der Temperatur, von der Anpassung an die Ankunftsbedingungen von 37 ppt. Die Abnahme des Salzgehalts war eine Folge des regelmäßigen Austauschs des Wassers aus den Außenbecken. Dies geschah aufgrund von steigenden Ammonium- und Nitritgehalten und dem Nachfüllen von Nordseewasser aus dem Wasserspeicher, welches eine geringere Salinität (26 ppt – 27 ppt) aufwies. Dieser Effekt war gewünscht, da Goldbrassen bei etwas geringerem Salzgehalt unter vollmarin besser wachsen.

Der pH-Wert betrug während der ersten dreißig Versuchstage durchschnittlich  $8,13 \pm 0,06$  im Außenbecken 1 und  $8,15 \pm 0,06$  im Außenbecken 2. Im späteren Versuchsverlauf sank der pH-Wert im Außenbecken 1 auf durchschnittlich  $7,89 \pm 0,09$  und im Außenbecken 2 auf  $7,88 \pm 0,10$ . Eine Veranschaulichung ist in der Abbildung 7 zu finden.

## Material und Methoden

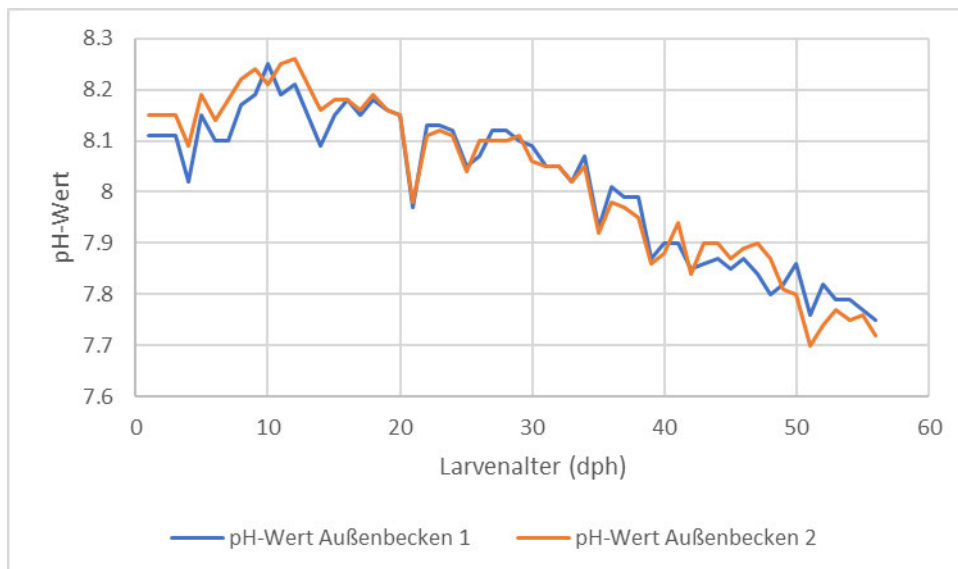


Abbildung 7 Aufzeichnung der während der Versuchszeit gemessenen pH-Werte beider Außenbecken.

Die gemessenen Werte zeigen geringe Unterschiede zueinander auf. Aufgrund der Skalierung, um Unterschiede deutlicher aufzeigen zu können, wirkt der pH-Wert jedoch stark schwankend. Zunächst kann ein Anstieg des pH-Wertes von Tag 6 dph bis etwa 12 dph erkannt werden. Ab 13 dph sinkt der pH-Wert bis zum letzten Versuchstag. Letzteres lässt sich, wie bei dem Abfall der Salinität, durch den Aufwind eines Steigenden Ammonium- und Nitritspiegels vorgenommenen Wasserwechsel erklären: Am Tag 13 nach dem Schlüpfen der Larven wurde der erste Wasserwechsel vorgenommen. Am nächsten Tag erkennt man die Absenkung des pH-Wertes. Ein Wasserwechsel kann dazu führen, dass abgesetzte Verschmutzungen, wie zum Beispiel organisches Material, in Suspension geht und sich die bakteriellen, pH-senkende Aktivitäten dadurch erhöhen. In Folge dessen nimmt der pH-Wert ab. Mit steigender Anzahl der Wasserwechsel sank der pH-Wert in beiden Außenbecken, erreichte jedoch keine kritischen Werte.

Der Ammonium- und der Nitritgehalt wurden beide täglich durch jeweils ein MColortest™-Test-Kit kontrolliert. Die Methode basiert auf kolorimetrischer Bestimmung, bei welcher semiquantitativ durch einen visuellen Farbvergleich zwischen der Probe und vorgegebenen Farbwerten der jeweilige Gehalt bestimmt wird. Bei einem zu hohen Anstieg von Ammonium oder Nitrit wurde bei dem jeweiligen Außenbecken ein größerer Wasserwechsel durchgeführt, um die Wasserqualität zu gewährleisten und den Gehalt im Becken zu senken. Ein Anstieg beider Gehalte ließ sich jedoch nicht vermeiden, wodurch ein Endgehalt von 4,5 mg/L an Ammonium in Außenbecken 1 und 3,0 mg/L in Außenbecken 2 und ein Endgehalt von 3,0 mg/L an Nitrit in beiden Außenbecken. Eine Veranschaulichung beider Wasserwerte ist in Abbildung 8 zu finden.



## Material und Methoden

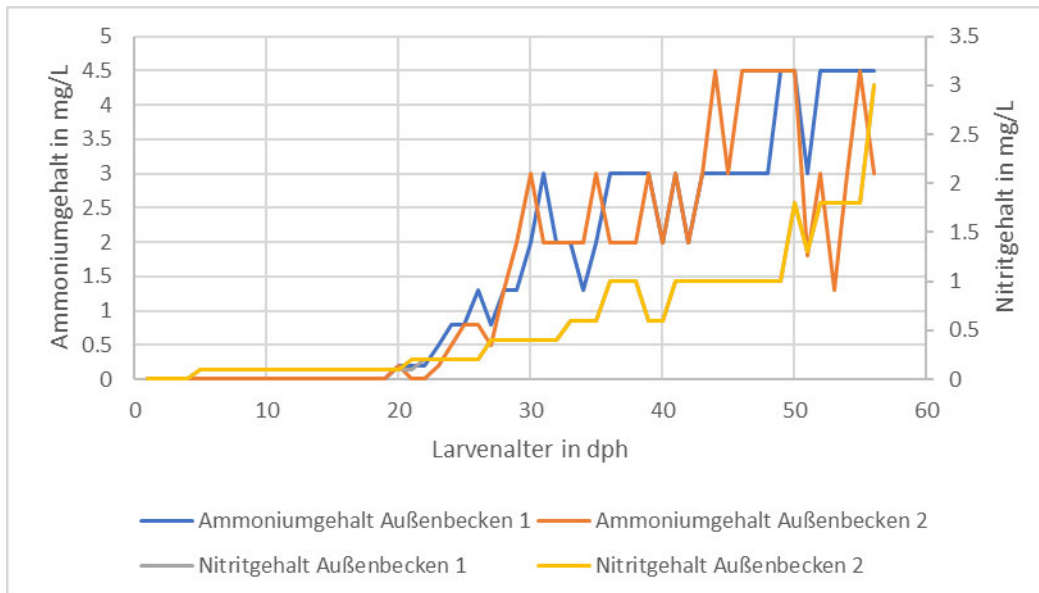


Abbildung 8 Aufzeichnung der während der Versuchszeit gemessenen Ammonium- und Nitritgehalte beider Außenbecken.

Bei den aufgezeichneten Ammoniumwerten über den Versuchszeitraum werden die Unterschiede zwischen den beiden Außenbecken ab 20 dph größer und der Ammoniumgehalt innerhalb eines Beckens beginnt stärker zu schwanken. Eine Erklärung dafür ist, dass bei zu hohen Konzentrationen von Ammonium das Wasser in den Außenbecken mit frischem Wasser aus dem Speicher gewechselt wurde. Jedoch kann ein Wasserwechsel dazu führen, dass abgesetzte Verschmutzungen, wie zum Beispiel organisches Material, in Suspension gehen und sich die bakteriellen Aktivitäten dadurch erhöhen. Dadurch erhöht sich auch der Gehalt von Ammonium. Welche Verschmutzungen sich lösen und wie stark die Aufwirbelung ist, ist von den Becken selbst und den darin eingelassenen Tanks abhängig. Somit können in diesen Werten Unterschiede entstehen, auch wenn die Becken ansonsten gleich behandelt worden sind. Der Aufwirbelungseffekt ist in den Graphen des Nitritgehaltes nicht präsent. Hier sind die Unterschiede in den Nitritgehalten fast identisch zwischen den Außenbecken. Jedoch lässt sich sowohl ein Anstieg erkennen, als auch ähnliche Schwankungen innerhalb eines Beckens.

Bis einschließlich 3 dph wurden die Larven unter Lichtausschluss in den Tanks gehalten. Ab 4 dph wurde eine 16-stündige Photoperiode zwischen 09:00 und 01:00 Uhr (16 h: 8 h Lichtregime) angewandt, einschließlich einer 30-minütigen Dämmerungsperiode zur Simulation von Sonnenaufgang und -untergang. Die Lichtintensität lag zwischen 600 und 800 Lux an der Wasseroberfläche der Aufzuchtbecken mit einer kurzfristigen Absenkung auf 180 – 300 Lux ab 21 dph. Dies wurde mit einem Illuminometer nachgemessen.

### 2.2.4 Fütterungsregime

Für die Aufzucht der Goldbrassenlarven wurden sechs unterschiedliche Fütterungsregime erstellt. Aufgrund einer Zugabe der falschen Größe an Copepoden von *A. panamensis* bei der Fütterung, musste die Treatmentgruppe 5 wegen hoher Verluste aus dem Versuch rausgenommen werden. Infolge der für die gegebene Fragestellung wegfallenden Vergleichbarkeit zu der Treatmentgruppe 5 des Versuches, musste auch die Gruppe 6 aus der Auswertung dieser Arbeit entfallen. Die in dieser Arbeit ausgewerteten Regime sind in der Abbildung 9 zu finden.



## Material und Methoden

Die erste Fütterung der Larven erfolgte an 4 dph. Im Allgemeinen erfolgte die erste Fütterung des Tages um 9 Uhr und die Letzte um 24 Uhr. Hierbei wurde ein Fütterungssystem verwendet, welches mittels einer Zeitschaltung eine Dosierpumpe aktivierte. Diese pumpte das in einem gekühlten Vorratsgefäß befindliche Lebendfutter mit Hilfe von Schläuchen in die einzelnen Tanks. Dabei führte zu jedem Tank ein eigener Schlauch, dessen Gegenstück händisch vor der ersten Fütterung in das jeweilige Behältnis mit dem Lebendfutter getaucht wurde. Vor der letzten Fütterung wurde das Lebendfutter verdünnt, um für den nächsten Tag möglichst wenig Rückstände des alten Lebendfutters in den Schläuchen zu haben.

Bei der Verfütterung von micro diets wurde ein automatisches, zeitgesteuertes Fütterungssystem verwendet. Dieses computergesteuerte Fütterungssystem aktiviert sogenannte „Feeders“ mit Impulsbefehlen, welche beim kurzen Öffnen eine geringe Trockenfuttermenge in die Tanks geben („Shots“). Je nach gewünschter Futtermenge können auch mehrere Impulsbefehle hintereinander gegeben werden oder die Anzahl der täglichen Fütterungen (Fütterungsevents) angepasst werden. Dabei ist für diesen Fütterungsversuch wichtig, dass pro Mal nur eine geringe Menge an MD ausgegeben wird, aber dafür die Anzahl der Fütterungsevents höher ist.

## Material und Methoden

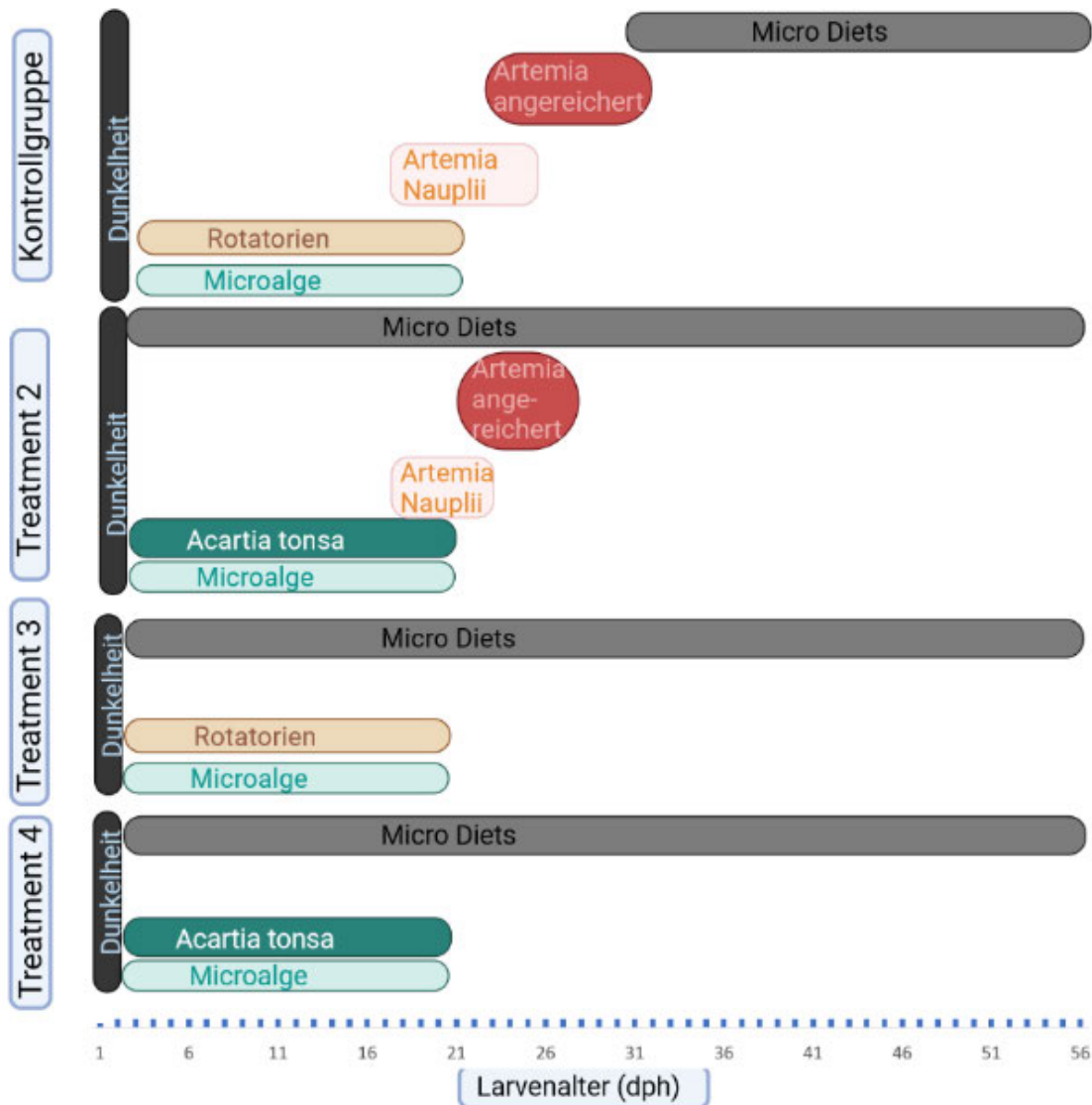


Abbildung 9 Fütterungsregime der vier verwendeten Treatments mit schematischer Darstellung einzelner Fütterungskomponenten.

Die vier verwendeten Treatments wurden in ihre Fütterungskomponenten unterteilt. Diese wurden entsprechend dem Zeitraum, in dem sie verwendet worden sind, in der Darstellung eingefügt. Gleiche Komponenten in verschiedenen Treatments erhielten dieselbe Farbe. Wie dargestellt, bekamen alle Gruppen ab 4 dph ihre ersten exogenen Fütterungen, je nach Treatment eine Kombination aus Rotatorien oder Copepoden mit Microalgen durch das Green Water. Bis auf die Kontrollgruppe, erhielten alle betrachteten Gruppen ebenfalls MD ab 4 dph. Alle Gruppen erhielten ihre jeweiligen Microalgen/Lebendfutter-Kombination bis einschließlich 20 dph. Die Kontrollgruppe (Treatment 1) und Treatment 2 erhielten in ihren Treatments zusätzlich frisch geschlüpfte Artemia-nauplien und angereicherte, 48 Stunden alte Artemien-nauplien.

Die Kontrollgruppe erhielt die für die Aufzucht derzeit in professionellen Brutbetrieben etablierten Standardfütterungsprotokolle mit Rotatorien der Spezies *Brachionus plicatilis* bis zum 20 dph. Dabei werden den Larven ab 18 dph zusätzlich frischgeschlüpfte, nicht angereicherte *Artemia salina* Nauplien (AF,  $\pm 430 \mu\text{m}$ ) zu fressen gegeben. Die AF wurden bis zum 25 dph verfüttert.

## Material und Methoden

In einer Übergangsphase von 23 – 25 dph wurden zu den AF zusätzlich angereicherte *Artemia*-nauplien (AA,  $\pm 660 \mu\text{m}$ ) angeboten. Das Anreicherungsverfahren ist in Abschnitt 2.2.5.3 beschrieben. Die Larven der Kontrollgruppe wurden bis zum 32 dph von angereicherten Artemien ernährt, ab 30 dph wurden dann nach einer Übergangsphase nur noch micro diets bis zum Ende der Aufzucht verfüttert. Die Größen, Zusammensetzungen und Zeiträume der Übergänge, der in der Aufzucht verwendeten MD für alle Gruppen, sind in Abschnitt 2.2.6 zu finden.

Die zweite Treatmentgruppe lässt sich zusammenfassen als Co-Fütterung von Copepoden der Art *Acartia tonsa* mit micro diet. Von Beginn der Fütterung an Tag 4 erhielt die zweite Gruppe eine für das ontologische Entwicklungsstadium passende micro diet und *Acartia tonsa* Copepoden. Die *Copepoden*-nauplien wurden bis 20 dph verfüttert. Ab 18 dph wurden die Larven zusätzlich mit frischgeschlüpften, nicht angereicherten *Artemia*-nauplien (s. Kontrolltreatment) gefüttert. Ab 21 dph wurden den Larven zu den nicht angereicherten Artemien zusätzlich angereicherte Artemien angeboten. Der Zeitraum für die Verfütterung angereicherter Artemien wurde kurzgehalten und ging von 21 dph bis 26 dph. Micro diets wurden bis zum Ende des Versuches verwendet und nur an das Wachstumsstadium der Goldbrassenlarven angepasst (siehe. Abschnitt 2.2.6).

Die dritte Gruppe erhielt ebenfalls ab dem ersten Fütterungstag eine Co-Fütterung, jedoch wurden hier Rotatorien (*B. plicatilis*) und micro diet zusammen angeboten. Wie auch in Gruppe 2, wurde das micro diet bis zum Versuchsende durchgängig verfüttert. Dabei wurde auch hier nur das MD der Größe der Wachstumsphase der Larven angepasst (siehe. Abschnitt 2.2.6). Die Fütterung mit Rotatorien endete an 20 dph.

Die Treatmentgruppe 4 startete wie die Gruppe 2 auf einer Diät mit *A. tonsa* und derselben micro diet und Anpassung der micro diet, wie in Gruppe 2 und 3. Die Verfütterung von *A. tonsa* endete am 20 dph, wie in Gruppe 2.

### **2.2.5 Bereitstellung des Lebendfutters**

Für die verschiedenen Fütterungen muss das Lebendfutter in einer genügenden Menge bereitgestellt werden. Dafür hat jede Lebendfutterart ihr eigenes Verfahren und wird unabhängig der anderen Arten aufgezogen, geerntet und bereitgestellt. Vor, während und nach der Ernte wird darauf geachtet, dass die Materialien, welche für eine Art verwendet worden sind, nicht mit anderen Arten oder deren Erntematerialien in Kontakt kommen und nach Benutzung direkt gereinigt werden.

Die Mengen des zu erntenden Lebendfutters sind abhängig von der Anzahl der Fütterungsevents und der zu verfütternden Lebendfutterindividuen pro Volumen im Aufzuchtank.

In den folgenden Abschnitten ist die Ernte, Anreicherung und Bereitstellung des Lebendfutters für jede Lebendfutterart detailliert erklärt.

#### **2.2.5.1 Rotatorien (*Brachionus plicatilis*)**

Die Rotatorien wurden vor dem Beginn des Versuches auf die benötigte Menge an Individuen gebracht. Die Kulturen wurden in dafür speziell hergerichteten, 15 L und 90 L fassenden Wasserkanistern aus lichtdurchlässigem Plastik bei einer Salinität zwischen 20 – 35 ppt, einer Temperatur zwischen 24 °C und 25 °C und einem pH-Wert zwischen 7 und 8,5 gehalten. Die Flaschen wurden belüftet und von oben beleuchtet. Die Temperatur wurde von T-Controllern automatisch durch Heizstäbe. Das verwendete Wasser stammt aus einem Speichertank, welcher mit Nordseewasser gefüllt war und mit Ozon behandelt wurde. Dieses Wasser wurde anschließend in einem Rundbecken einige Tage mit UV-Licht behandelt und das darin enthaltene Ozon wurde durch Belüftung entfernt. Das *Nannochloropsis*-Konzentrat, welches auch im Abschnitt 2.2.2 für die „Green Water technique“ verwendet worden ist, wurde als Futtermittel für die Rotatorien genutzt. Die Menge hing von der jeweiligen Tagesdichte der Rotatorien ab. Die Menge der Individuen wurde täglich über eine 1 mL Probe mittels einer Zählkammer unter dem Mikroskop überprüft und eine Gesamtmenge bestimmt. Zur Reduktion der Wasserverschmutzung enthielt jeder Wasserkanister ein Filtervlies.

Für die Entnahme der Rotatorien, war am Boden der verwendeten Wasserkanister ein Kugelhahn angebracht. Die Ernte erfolgte jedoch erst sobald die Temperierung ausgeschaltet und die Belüftung und das Filtervlies entfernt worden war.

## Material und Methoden

Für die Ernte wurde ein Rohrfilter mit einer Maschenweite von 35 µm verwendet. Der Filter wurde unter den Kugelhahn gehalten, sodass die Rotatorien im Inneren des Rohres auf dem Filter aufkonzentriert werden konnten. Anschließend wurden die Rotatorien mit Salzwasser in einen Messbecher überführt und mit Salzwasser auf die erforderliche Konzentration gebracht.

Der Messbecher wurde in eine Styroporbox mit Eis gestellt. Anschließend wurden die Schläuche der entsprechenden Aufzuchtanks in den Messbecher gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schläuche durch Gewichte nahe des Becherbodens gehalten wurden. Diese Schläuche zogen die eingestellten Milliliter an Rotatorien mit Salzwasser durch das Fütterungssystem und leiteten dies anschließend in die richtigen Tanks.

Eine Übersicht der pro Tag verfütterten Individuenzahl und der Anzahl der Fütterungsevents ist in Abbildung 10 zu finden.

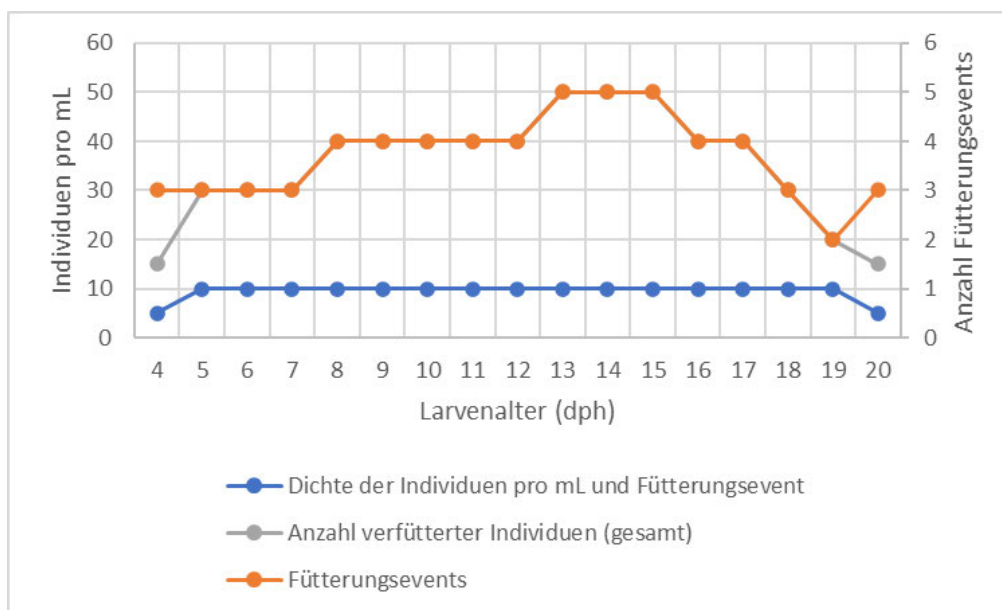


Abbildung 10 Veranschaulichung der verfütterten Copepodenindividuen pro Milliliter je Fütterungsevent, die verfütterte Menge pro Milliliter insgesamt an einem Tag und die Anzahl der Fütterungsevents für die Treatments 2 und 4.

Während der Lebendfütterung wird versucht eine geringe Menge an Individuen pro Milliliter pro Fütterungsevent zu halten, um zu gewährleisten, dass die Viskosität pro Milliliter gering bleibt und die Schläuche der Dosierpumpen nicht verstopfen. Eine Anpassung an die benötigte Futtermenge wird durch eine höhere Anzahl an Fütterungsevents oder eine geringe Erhöhung der Dichte erreicht. Letzteres wird jedoch nur verwendet, sollte die Anzahl an Fütterungsevents eine zu hohe Frequenz erreichen. Das Volumen, welches von den Dosierpumpen gefördert wird, ist in jedem Fütterungsevent dasselbe. Die langsame Erhöhung der micro diet Menge und im Falle des Treatments 2 der Menge an verfütterten Artemien parallel zu der Verfütterung der Copepoden führte zu einer Abnahme an der Gesamtmenge an Lebendfutter ab Tag 15.

### 2.2.5.2 Copepoden (*Acartia tonsa*)

Die Copepoden wurden in zylindrischen, konisch zulaufenden Tanks mit einem Fassungsvermögen von 250 L aus lichtdichtem Polyethylen aufgezogen. Dieser hatte an der Unterseite einen Kugelhahn, durch welchen geerntet wurde. Für die Aufzucht wurden *A. tonsa* Eier der Firma CFEED verwendet, welche 48 h vor der Verfütterung angesetzt werden. Die in dieser Studie verwendeten *Copepoden*-Nauplii erreichten eine Größe von 70 – 100 µm. Die *A. tonsa* Eier werden desinfiziert und in Ton eingelegt in Flaschen geliefert. Für die Aufzucht wurden die Eier entsprechend der Schlupfrate und der zu verfütternden Menge dosiert. Mit dem Ton werden die Eier in den Tanks inkubiert. Auch hier wurde mit einem T-Controller und mit einem Heizstab die Temperatur des Wassers zwischen 24 °C und 25 °C gehalten. Das verwendete Aufzuchtswasser stammt aus derselben Quelle, wie das Wasser für die Rotatorien in 2.2.5.1. Die Copepoden wurden bei einer Salinität von 30 ppt bis 35 ppt bei Sauerstoffbelüftung und unter Beleuchtung inkubiert.

Die Ernte der Copepoden erfolgte über einen Schlauch, welcher an den Kugelhahn angebracht werden konnte. Der Tankinhalt wurde beim Ablassen über den Schlauch auf einem breiten Rohrfilter mit der Maschengröße 50 µm gefiltert. Um einen Verlust an Copepoden durch den ungebremsten Fall auf den Filter oder längere Zeit an der Luft zu vermeiden, wurde der Filter während dem Erntevorgang in einer Wanne aus Polyethylen gehalten. Die sich im Inneren des breiten Rohrfilters befindenden Copepoden wurden mehrmals mit Salzwasser gespült, um sie von Tonresten zu befreien. Anschließend wurden die Copepoden in einen Messbecher überführt und auf die richtige Konzentration gebracht.

Wie bei den Rotatorien wurde auch hier der Messbecher in eine Styroporbox mit Eis gestellt und die Schläuche für die Fütterung in dem Messbecher befestigt. Eine Übersicht der pro Tag verfütterten Individuenzahl und der Anzahl der Fütterungsevents ist in Abbildung 11 zu finden.

## Material und Methoden

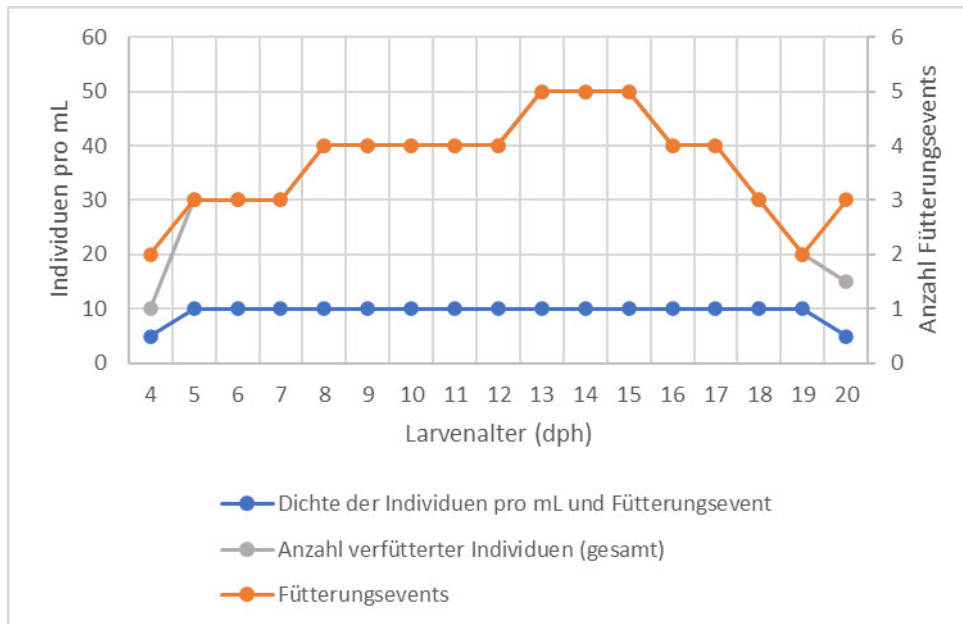


Abbildung 11 Veranschaulichung der verfütterten Rotatorienindividuen pro Milliliter je Fütterungsereignis, die verfüttert Menge pro Milliliter insgesamt an einem Tag und die Anzahl der Fütterungsereignis für die Treatments 1 (Kontrolltreatment) und 3.

Eine Erklärung der Abbildungselemente ist in Abbildung 10 zu finden.

### 2.2.5.3 Artemien (*A. salina*)

Die *Artemia*-nauplien von Ocean Nutrition wurden in zwei Varianten verfüttert: die frischgeschlüpften und nicht angereicherten *Artemia*-nauplien (AF, Verfütterung 24 h nach dem Schlüpfen,  $\pm 430 \mu\text{m}$ ) und die angereicherten *Artemia*-nauplien (AA, Verfütterung 48 h nach dem Schlüpfen,  $\pm 660 \mu\text{m}$ ).

Beide diese Gruppen hatten dasselbe Verfahren bis zur Anreicherung: Die benötigte Menge an *Artemia* Cysten unter Berücksichtigung der Schlupfrate wurde in zylindrisch, konisch zulaufenden Tanks inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass für eine optimale Schlupfrate nicht mehr als 2 g an Zysten pro Liter in den Tank gegeben wurden. Die Tanks fassten 90 L und bestanden aus lichtdurchlässigem Polyethylen, an denen am Tankboden ein Kugelhahn für die Ernte angebracht war. Das Wasser stammt aus demselben Speicher wie in 2.2.5.1. Die Temperierung verwendete die gleichen Heizstäbe und T-Controller. Die Temperatur betrug zwischen 25 °C und 27 °C. Für die Belüftung und Beleuchtung wurde ebenfalls das gleiche System wie in 2.2.5.1 verwendet, sowie die gleichen Filtervliese. Die Bestimmung der tatsächlichen Menge an *Artemia*-nauplien nach dem Schlüpfen wurde mit demselben Verfahren wie in 2.2.5.1 durchgeführt.

## Material und Methoden

Die erste Ernte erfolgte nach 24 h im Aufzucht tank. Für die Ernte wurde die Beleuchtung von oben und die Temperierung ausgeschaltet und die Belüftung und das Filtervlies entfernt. Anschließend wurde eine Notfalllampe unter dem Tank platziert, sodass eine Beleuchtung von unten stattfand. Artemien sammeln sich aufgrund der positiven Phototaxis im unteren Bereich des Aufzucht tanks. Dadurch trennen sich die geschlüpften Nauplien von den Zysten schalen und können durch vorsichtiges Ablassen des Tanks von den Schalen getrennt werden. Die Trennung erfolgt, da das Verschlucken der Schalen bei Fischlarven eine Schädigung des Verdauungstraktes hervorrufen und so zum Tod der Larve führen könnte.

Das Abfiltrieren der *Artemia*-nauplien erfolgt über einen Rohrfilter mit der Maschengröße 50 µm. Bei den Artemien, die nicht angereichert werden sollten (AF), wird der Inhalt des Filters mit Salzwasser in einen Messbecher ausgewaschen und darin auf die benötigte Konzentration gebracht. Wie auch bei den vorher aufgeführten Lebendfuttern, wurde der Messbecher in eine Styroporbox mit Eis gestellt und die Schläuche für den Reefdoser mit Gewichten im Messbecher platziert.

Die Artemien, welche angereichert werden sollten (AA), werden nach der ersten Ernte in einen schon vorbereiteten Tank mit denselben Aufzucht sbedingungen wie davor gegeben. Dem Wasser wurde dann ein Anreicherungsmittel von INVE (*S. presso*) zugesetzt, welches unter anderem hohe Konzentrationen von Vitaminen, Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) enthält, um einen höheren Nährwert zu erreichen. Der Zusatz von *S. presso* erfolgte durch Emulgation des Mittels in lauwarmen Wasser mit einer einminütigen Durchmischung mit einem Stabmixer der Firma Braun und anschließender Zugabe des Emulgates in den Aufzucht tank. Nach weiteren 24 h in einem Aufzucht tank, wurde die Ernte durchgeführt, wie bei den nicht angereicherten Artemien beschreiben. Graphische Darstellungen der verfütterten Mengen an frischen und angereicherten Artemien sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 zu finden.



## Material und Methoden

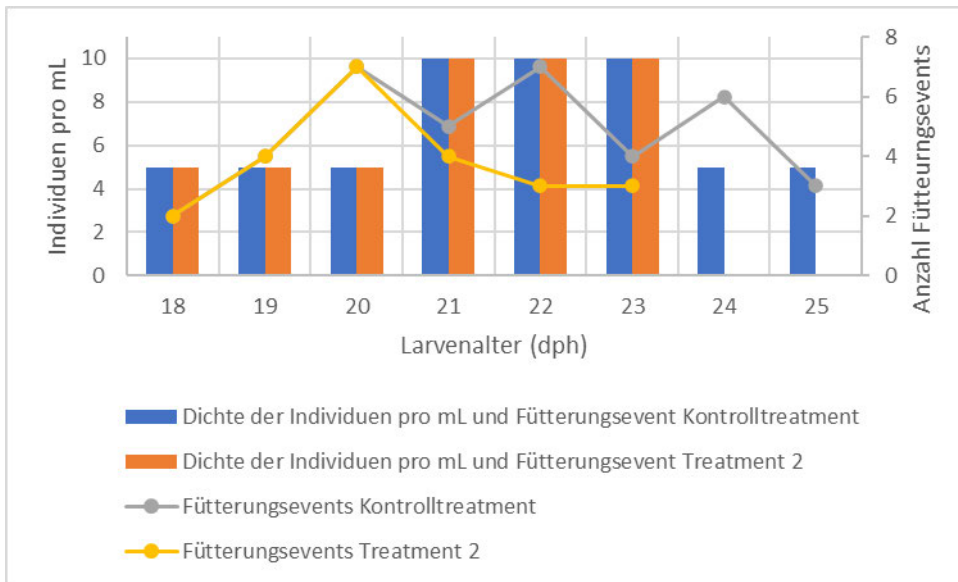


Abbildung 12 Veranschaulichung der verfütterten, frischen Artemien für das Treatment 1 (Kontrolltreatment) und das Treatment 2.

Die Säulen stellen die Dichte der Individuen pro Milliliter und Fütterungsereignis dar und die Anzahl der Fütterungsereignisse wird durch Linien mit Datenpunkten dargestellt. Aus den gegebenen Daten kann eine Gesamtindividuenzahl für den jeweiligen Tag entnommen werden.

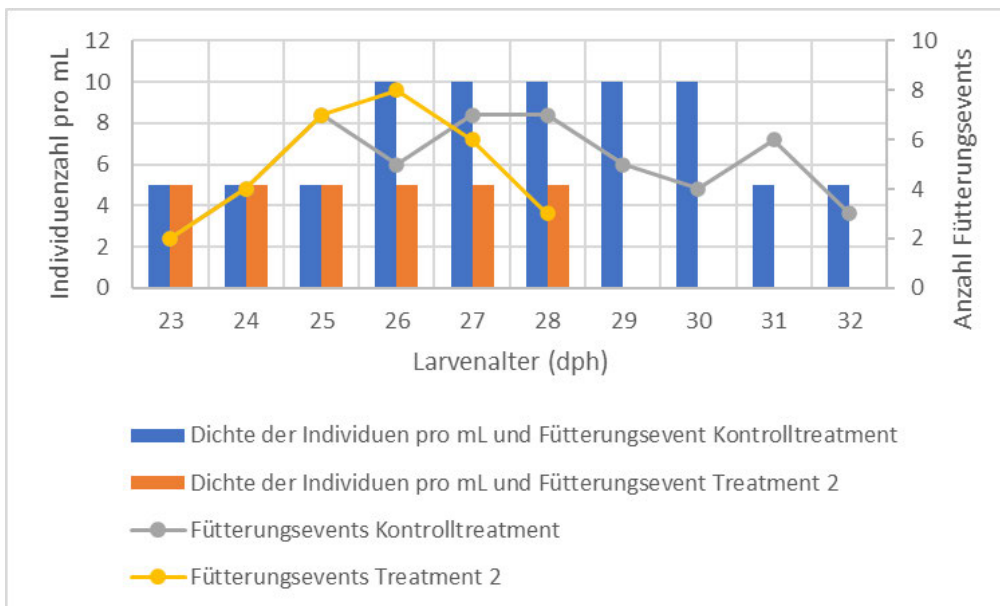


Abbildung 13 Veranschaulichung der verfütterten, angereicherten Artemien für das Kontrolltreatment (Treatment 1) und das Treatment 2.

Die Säulen stellen die Dichte der Individuen pro Milliliter und Fütterungsereignis dar und die Anzahl der Fütterungsereignisse wird durch Linien mit Datenpunkten dargestellt. Aus den gegebenen Daten kann eine Gesamtindividuenzahl für den jeweiligen Tag entnommen werden.

## Material und Methoden

### 2.2.6 micro diets

Die in den Experimenten dieser Arbeit verwendeten micro diets stammen von der Firma Skretting. Diese MD werden unter dem Namen „GEMMA Neo for sea bream“ („GEMMA Neo für Goldbrassen“) in verschiedenen Größen und Rezepturen für unterschiedlich alte Larvenstadien angeboten. Dabei entspricht die Nummer hinter dem Produkt der Größe der Partikel in Millimetern. So entspricht ein Futterpartikel von GEMMA NEO 0.1 etwa 100  $\mu\text{m}$ . Die Auswahl der Partikelgröße wurde im Laufe des Versuches auf die Goldbrassenlarven entsprechend angepasst und wie in der Abbildung 14 dargestellt an die Larven verfüttert.

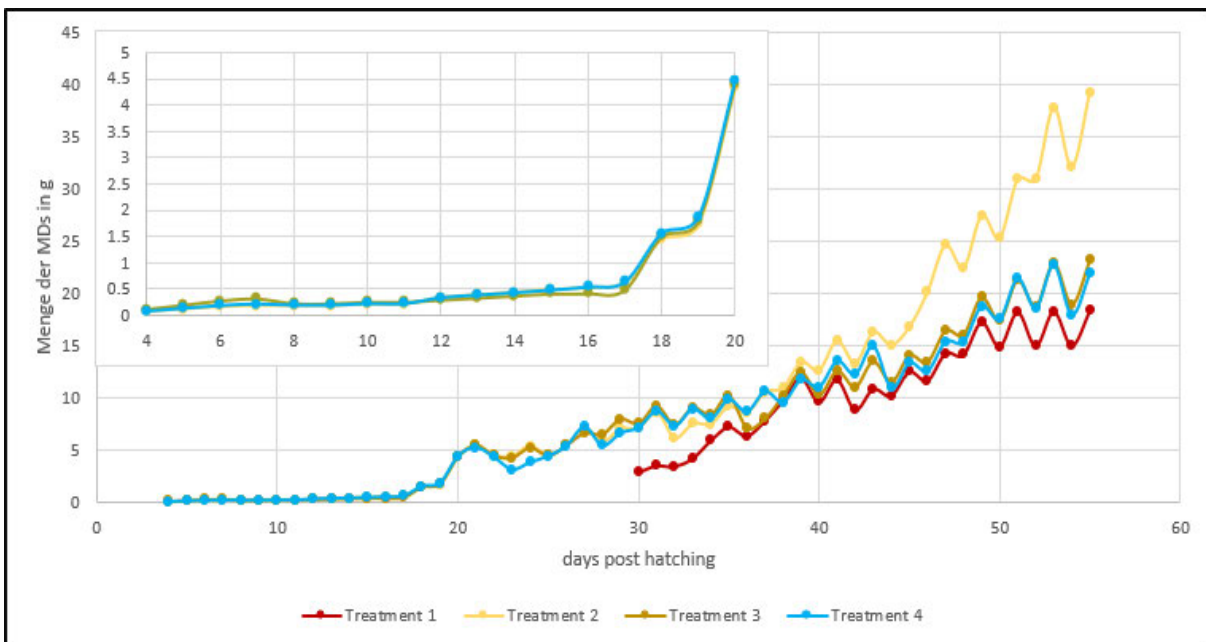


Abbildung 14 Gemittelte Menge der verfütterten MD in Gramm in 24 Stunden über den gesamten Versuchszeitraum für alle Treatments.

In der klein eingblendeten Graphik sind die Fütterungstage 4 dph bis 20 dph vergrößert dargestellt. Die Legende bezieht sich auf beide Diagrammteile. Aufgrund geringer Mortalitäten in Treatment 2 (s. Abschnitt 3.1 Mortalitätsrate) wurde für dieses Treatment eine höhere Menge an micro diet verwendet, um die Futterkonzentration an die höhere Überlebensrate der Larven anzupassen.

In den Abbildungen im Anhang (Abbildung 39 - Abbildung 42) sind die verfütterten Mengen für die einzelnen Tanks dargestellt. In dem Zeitraum von 4 dph bis 17 dph wurde ausschließlich GEMMA NEO 0 (10 – 110  $\mu\text{m}$ ) verwendet. Ab Tag 18 dph wurde eine Mischung von GEMMA NEO 0 und 0.1 (100 – 250  $\mu\text{m}$ ) verwendet, um die Larven an das zweite Futter zu gewöhnen. Ab 22 dph bis 29 dph wurde nur noch das GEMMA NEO 0.1 verwendet.

## Material und Methoden

Ab 30 dph wurde dieses mit dem GEMMA NEO 0.2 (250 – 400 µm) vermischt, wobei die Menge an 0.2 zunahm und 0.1 abnahm, bis an 36 dph nur noch das GEMMA NEO 0.2 verwendet wurde. Die dritte Umstellung fand an 46 dph statt mit der Vermischung des GEMMA NEO 0.2 und 0.3 (300 – 550 µm) bis 51 dph. Ab 52 dph bis zum Ende des Versuchszeitraumes wurde nur das GEMMA NEO 0.3 verwendet.

Das entsprechende micro diet für das jeweilige Larvenstadium wurde 48 Stunden vor der Verwendung in verschließbaren Probenbechern für jeden Tank einzeln ausgewogen und bei 4 °C gelagert. Am Morgen vor der ersten Fütterung wurden die sich im Feeder noch befindlichen Reste der vorher verfütterten MD für jeden Tank einzeln zurückgewogen, um die tatsächliche Fütterungsrate bestimmen zu können, und die für den entsprechenden Tank vorbereiteten frischen MD in die dann leeren Feeder eingefüllt. Wenn einer der Feeder auffällige Unterschiede im Rückwaagegewicht zeigte, wurde dieser entsprechend neu eingestellt (Menge der Fütterungseinheiten erhöht oder verringert) oder entsprechend gereinigt oder ausgetauscht. In Tabelle 9 ist die tatsächliche, im eigenen Labor überprüfte Zusammensetzung der Makronährstoffe der verwendeten MD aufgelistet. Die Angaben des Herstellers sind in Tabelle 10 zu finden.

*Tabelle 9 Übersicht der überprüften Zusammensetzung hinsichtlich der Trockenmasse, des prozentualen Aschegehaltes, des prozentualen Proteinanteils, des prozentualen Fettanteils und dem Energiegehalt in den in der Aufzucht verwendeten micro diets.*

Probe	Größe (µm)	% Trockenmasse	% Asche	% Protein	% Fett	Energie (MJ/kg) Kalorimetrie
GEMMA NEO 0.0	10 - 110	93.39	11.22	69.13	9.59	22.27
GEMMA NEO 0.1	100 - 250	92.66	10.45	68.90	9.30	22.66
GEMMA NEO 0.2	250 - 400	94.59	10.26	67.58	11.07	22.90
GEMMA NEO 0.3	300 - 550	95.19	10.21	68.25	11.48	22.77

## Material und Methoden

*Tabelle 10 Übersicht der von Hersteller angegebenen Zusammensetzung hinsichtlich der Trockenmasse, des Aschegehaltes, des prozentualen Proteinanteils und des prozentualen Fettanteils in den in der Aufzucht verwendeten micro diets.*

*Die prozentuale Trockenmasse und der Energiegehalt wurden beim Hersteller nicht angegeben.*

Probe	Größe (µm)	% Trockenmasse	% Asche	% Protein	% Fett	Energie (MJ/kg) Kalorimetrie
GEMMA NEO 0.0	10 - 110	nicht angegeben	12.50	60.00	11.00	nicht angegeben
GEMMA NEO 0.1	100 - 250	nicht angegeben	12.50	60.00	11.00	nicht angegeben
GEMMA NEO 0.2	250 - 400	nicht angegeben	12.50	60.00	11.00	nicht angegeben
GEMMA NEO 0.3	300 - 550	nicht angegeben	12.50	60.00	11.00	nicht angegeben

Der Hersteller gab bei allen Produkten dieselben prozentualen Werte für den Aschegehalt, den Proteinanteil und den Fettanteil an.

Bei der Überprüfung konnte jedoch festgestellt werden, dass die prozentualen Mengen voneinander und auch von den Abgaben des Herstellers abweichen: Der Aschegehalt liegt bei allen Proben unter den Angaben, dies jedoch nur um maximal 2 %. Hingegen liegt der Proteinanteil in allen Proben um fast 10 % über den Angaben. Bei dem Fettanteil liegen nur GEMMA NEO 0.2 und 0.3 etwa im angegebenen Bereich des Herstellers, GEMMA NEO 0 und 0.1 liegen beide mit ca. 1,5 % drunter.

### 2.2.7 Probenentnahme

Die Larven kamen am 1 dph aus der Aquakultur an. Um eine gleichmäßige Verteilung der Larven auf alle 24 Aufzuchtstanks zu gewährleisten, wurden Unterproben (50 mL) aus den Transportboxen entnommen und die Larven in dieser Unterprobe gezählt. Auf dieser Basis wurden dann entsprechende Volumina aus den Cubitainern gleichmäßig auf alle Versuchsbecken verteilt.

In der ersten Phase von 6 – 30 dph wurden alle drei Tage jeweils 15 Larven für die Parameter „Wachstum“, „Fettsäuren“ und „Enzyme“ aus jedem Tank entnommen und in ein 1,5 mL – Reaktionsgefäß überführt. Die Proben, welche am selben Tag aus demselben Tank für dieselbe Verwendung entnommen wurden, kamen zusammen in dasselbe Reaktionsgefäß. Die Reaktionsgefäße wurden durchgehend nummeriert. In dieser Phase wurde zur Probennahme eine Pasteurpipette aus Plastik verwendet und die Larven einzeln mit der Pipette aus dem Becken entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Larvenproben möglichst Zufallsverteilt entnommen wurden.

## Material und Methoden

Ab Tag 30 dph fand die Probenentnahme alle fünf Tage statt. Dabei wurde ab 40 dph ein Kescher als Hilfsmittel verwendet, um die sich in der Tiefe befindenden Larven ebenfalls erreichen zu können. Die Reaktionsgefäße wurden auf Eis gelagert, bis Proben aus allen Tanks entnommen wurden, und anschließend in einem Kühlschrank bei – 80 °C eingefroren. Dies geschieht, damit die Proben keine Veränderungen in z.B. dem Gewebe, den Enzymen o.Ä. erleiden und die Ergebnisse reproduzierbar sind. Während der gesamten Versuchszeit wurde die in Abbildung 3 gekennzeichnete Beprobungsreihenfolge eingehalten.

### **2.3 Erhebung der Mortalitätsrate**

Für die Bestimmung der Tagesmortalität bzw. der Gesamtmortalität wurde ab 4 dph mit einem Absauger der Boden der Aufzuchtbecken gereinigt und so Überreste von toten Larven neben anderem Material vom Boden entfernt. Alles zusammen wurde in einem Eimer aufgefangen, aus welchem im direkten Anschluss die toten Larven zusammen mit dem Material auf einem weißen Polyethylenblech ausgebreitet wurden. Auf diesem Blech wurden die toten Larven für den Tag für diesen Tank ausgezählt und die Anzahl notiert. Für die Gesamtmortalität in einem Tank wurden die Tagesmortalitäten über den gesamten Versuchszeitraum addiert.

Die Mortalitätsbestimmung wird berücksichtigt, um vergleichen zu können, ob das Überleben der Larven im Zusammenhang mit der frühen Ausbildung und Aktivität des Verdauungsenzyms Trypsin steht.

### **2.4 Erhebung der Wachstumsdaten**

Die Ergebnisse der Wachstumsdaten geben Aufschluss über den Erfolg eines Futterregimes in Hinblick auf die Parameter Längenwachstum, Höhenwachstum und Trockengewicht. Diese werden als wichtige Kriterien bei der Bewertung eines Fütterungsregimes verwendet und insbesondere das Gewicht integriert umfassend alle biotischen und abiotischen Faktoren während einer Fischlarvenaufzucht. Bei der Messung der Larvenlänge wurde die Standardlänge bestimmt. Dieses Maß wurde für die Wachstumsdaten vorgegeben, um Übereinstimmung mit dem Gesamtprojekt „Marines Zooplankton als Grundlage einer nachhaltigen, ressourcenschonenden Fischfütterung“, von welchem diese These einen Teilaspekt bearbeitet hat, zu gewährleisten.

## Material und Methoden

Die Wachstumsdaten wurden aus den während der Aufzucht entnommenen Proben im Zusammenhang mit den Enzymaktivitätsmessungen bestimmt. Es wurden immer jeweils vier Reaktionsgefäße aus dem -80 °C – Gefrierschrank, entnommen und zum Auftauen auf Eis gestellt. Die Wachstumsparameternaufnahme geschah in umgekehrter Reihenfolge der Probennahme.

Aus den Reaktionsgefäßen wurden die Proben in eine Petrischale überführt und auf einer Millimeterskala (Genauigkeit  $\pm 0,5$  mm) unter dem Mikroskop betrachtet. Dabei wurde die Standardlänge (SL, vom vorderen Ende der Larve bis zur Basis der Schwanzflosse) und die Höhe der einzelnen Larve ermittelt. Die Standardlänge wurde zur Aufzeichnung des Wachstums der Larve unter den gegebenen Bedingungen bestimmt. Die Messung der Höhe erfolgte, um festzustellen, ob ein isometrisches oder allometrisches Wachstum bei den Fischlarven vorliegt.

Die vermessenen Proben wurden einzeln in ein Reaktionsgefäß überführt. Diese waren aufsteigend nummeriert und in der entsprechenden Reihenfolge verwendet.

Die Proben wurden nach der Vermessung 24 Stunden lang mit einem Gefriertrockner gefriergetrocknet. Anschließend wurde das jeweilige Trockengewicht über eine Ultramikrowaage ermittelt und notiert. Es wurden insgesamt 4215 Proben ausgewertet.

### **2.5 Methoden der Trypsinanalyse**

Die gewählte Methode der Enzymaktivitätsanalyse beruht auf dem von Ueberschär (1993) entwickelten biochemischen Verfahren zur Bestimmung der Trypsinaktivität bei Fischlarven. mittels der Fluoreszenzphotometrie.

Diese Methode wurde gewählt, da sie eine weit höhere Empfindlichkeit als chromogene Methoden aufweist und auch Trypsin im Nanogrammbereich nachgewiesen werden kann. Damit wurde es möglich, die individuelle Trypsinkapazität bereits in den frühen Larvenstadien zu bestimmen. Das für diese Enzymanalyse verwendete Gerät war ein Fluoreszenzphotometer.

### **2.5.1 Funktionalität der Messmethode**

Die Messung der Trypsinmenge in den Fischlarvenproben erfolgt durch eine indirekte Bestimmung über die kataklystische Enzymaktivität. Für die Aktivitätsmessung wird das hochspezifische synthetische Substrat N $\alpha$ -Benzoyl-L-Arginin-4-Methylcoumarinyl-7-Amid (BZ-L-Arg-MCA) verwendet. Bei diesem Substrat handelt es sich um ein Amid, welches Arginin an einer fluoreszierenden Gruppe, hier dem Fluorophor 4-methylcoumarinyl-7-amid (MCA), gekoppelt hat. Peptidverbindungen, welche ein Arginin, Lysin oder modifiziertes Cystein enthalten, werden spezifisch von Trypsin als Endoprotease an diesen Aminosäuren gespalten.

Das Substrat hat im Grundzustand nur eine geringe Eigenfluoreszenz. Wenn jedoch die fluoreszierende Gruppe frei vorliegt, hat diese eine etwa 700-fach höhere Fluoreszenz als die am Substrat gebunden Form.

Dies wird sich bei dieser Messmethode zunutze gemacht, indem auf die katalytische Aktivität von Trypsin gesetzt wird: Pro Zeiteinheit wird durch das Trypsin eine bestimmte Menge an Fluorophor abgespalten, welche anschließend frei vorliegt. Die durch die Trypsinaktivität vom Substrat freigesetzten Fluorophore sind linear proportional zur Quantität von Trypsin im untersuchten Organismus. Dies bedeutet: Je mehr Enzyme aktiv sind, desto schneller werden Fluorophore freigesetzt.

Der Vorteil hier mit einer Ratenmessung zu arbeiten, anstatt zu einer Einpunktmessung ist, dass unterschiedliche Eigenfluoreszenzen durch unterschiedliche Größe und Gewebeeigenschaften vernachlässigt werden können, da bei dem kinetischen Messverfahren nur die Differenz zwischen den Messpunkten herangezogen wird. Aufwendige Reinigungsschritte des aus den Larven hergestellten Homogenats können daher entfallen.

### **2.5.2 Verwendbarkeit der Messmethode**

Um die Messmethode verwenden zu können, muss diese vergleichbar und reproduzierbar sein. Im vorliegenden Messverfahren muss unter anderem bei der Messung gegeben sein, dass die Änderung der Emission bei der Bestimmung der enzymatischen Aktivität pro Zeiteinheit linear ist. Zusätzlich muss auch gegeben sein, dass das Verhältnis von Enzymmenge und Emission proportional ist. Das bedeutet, dass nach einer Verdopplung der Enzymmenge auch eine Verdopplung der Emission erfolgen muss.

## Material und Methoden

Für die Prüfung der Linearität wird eine Standardkurve aus Standardtrypsin aus Schweinepankreas mit Rinderserum-Albumin in einem 1:10 Verhältnis eingewogen und eine Stammlösung mit einer Konzentration von 0,01 mg Trypsin und 0,1 mg BSA pro mL im vorbereiteten TRIS-Puffer erstellt. Für die Standardkurve werden aus der Stammlösung sechs Verdünnungen hergestellt. Die verwendeten Konzentrationen sind in der Abbildungsunterschrift in Abbildung 24 zu finden. Von diesen Verdünnungen und von der Stammlösung werden jeweils Triplikate gemessen. 50 µL Probe wurden in eine 96-Well-Microtiterplatte pipettiert und zügig 250 µL des Substrates hinzugegeben. Die Messung erfolgt zeitnah und unter denselben Bedingungen wie die Messung der Proben. Aus diesen Daten wurde eine lineare Standardkurve angefertigt, welche zusätzlich im Zeitraum der Probenmessungen regelmäßig zur Kontrolle der technischen Eigenschaften des Fluoreszenzphotometers neu erstellt wurde.

Um die Proportionalität zu gewährleisten und um anschließend die Konzentration des Fluorophors bzw. der Menge des durch Trypsin hydrolysierten Substrates zur gemessenen Fluoreszenz bestimmen zu können, wird eine Eichkurve mit dem reinen Fluorophor erstellt. Dafür werden 2 mg MCA in 400 µL Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva) gelöst. Aus dieser Basislösung werden mit TRIS-Puffer eine  $2,88 \times 10^{-6}$  molare Stammlösung erstellt. Anschließend wurden Verdünnungen mit aufsteigenden Konzentrationen hergestellt. Die verwendeten Konzentrationen sind in der Abbildungsunterschrift der Abbildung 25 zu finden. Jede Verdünnung wird in Triplikaten von je 300 µL unter den gleichen Bedingungen wie die Larvenproben gemessen. Die aus den gemessenen Werten erstellte Eichkurve wurde mittels einer linearen Regression angepasst. Aus der Regressionsgeradengleichung kann dann die Trypsinaktivität über die Menge an freigesetzten Fluorophoren pro Zeiteinheit errechnet werden

In Tabelle 11 ist das verwendete Pipettierlayout dargestellt.



## Material und Methoden

Tabelle 11 Pipettierlayout für die 96-Well Mikrotiterplatte für die Trypsin-Standardkurve und die Eichkurve mit MCA.

Die Abkürzung Try steht für Trypsin. Die Zahlen hinter Try und MCA stehen für die jeweilige Konzentration, welche in dieses Well pipettiert werden soll. Die grau hinterlegten Felder in der Abbildung sind Felder, in denen entweder der TRIS-Puffer für den Blankwert gemessen wird, oder in denen keine Messung stattfindet.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	TRIS	MCA 19.2	MCA 144	MCA 336	TRIS	Try 1.66		
2	TRIS	MCA 19.2	MCA 144	MCA 336	TRIS	Try 1.66		
3	TRIS	MCA 19.2	MCA 144	MCA 336	TRIS	Try 1.66		
4	MCA 4.8	MCA 24	MCA 192	MCA 384	Try 0.10	Try 3.32		
5	MCA 4.8	MCA 24	MCA 192	MCA 384	Try 0.10	Try 3.32		
6	MCA 4.8	MCA 24	MCA 192	MCA 384	Try 0.10	Try 3.32		
7	MCA 9.6	MCA 48	MCA 240	MCA 480	Try 0.50	Try 5.0		
8	MCA 9.6	MCA 48	MCA 240	MCA 480	Try 0.50	Try 5.0		
9	MCA 9.6	MCA 48	MCA 240	MCA 480	Try 0.50	Try 5.0		
10	MCA 14.4	MCA 69	MCA 288	MCA 720	Try 1.0	Try unv.		
11	MCA 14.4	MCA 69	MCA 288	MCA 720	Try 1.0	Try unv.		
12	MCA 14.4	MCA 69	MCA 288	MCA 720	Try 1.0	Try unv.		

### 2.5.3 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Messung wurden die für den Messtag vorgesehenen Reaktionsgefäße mit den entsprechenden Fischlarvenproben aus dem  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  - Gefrierschrank entnommen und in eine mit Eis gefüllte Styroporbox zum Auftauen gestellt. Nach dem Auftauen wurden die Fischlarven aus den Reaktionsgefäßen in eine Petrischale überführt und unter dem Binokular betrachtet. Hier wurden wie bei der Wachstumsparameternaufnahme die Länge und der Darmfüllstand bestimmt und dokumentiert. Die Länge der Larven wurde als Totallänge (TL), von der Maulspitze bis zum Schwanzflossenende, gemessen. Die Messgenauigkeit betrug  $\pm 0,5\text{ mm}$ .

Es wurden pro Probenstag und Futterregime jeweils 40 Larvenproben vermessen. Direkt nach der Vermessung wurde die jeweilige Larve mit deionisiertem Wasser gespült und mit einer Federstahlpinzette in ein eigenes, gekühltes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. In diesem wurde die Larve mit auf Eis gekühltem TRIS-HCL Puffer (siehe Abschnitt 2.1.5) mit einem motorisiertem Mikropistill homogenisiert. Beim Homogenisieren werden 250  $\mu\text{L}$  oder 500  $\mu\text{L}$  des Puffers verwendet. Die Menge an Puffer wird an die Enzymaktivität der Larven entsprechend dem Larvenalter angepasst, um spätere Verdünnungsschritte zu vermeiden. Der Mikropistill wurde nach jeder Verwendung mit destilliertem Wasser gespült.

## Material und Methoden

Nachdem alle Proben für den Messtag homogenisiert wurden, wurden die Proben-Reaktionsgefäße mit den Homogenaten in eine Zentrifuge überführt, um Zell- und Geweberückstände abzusedimentieren. So können die Enzymmoleküle sich nicht an diesen anlagern und die Messung wird nicht durch Interferenzen verfälscht. Es wurde bei 0 °C für 30 Minuten bei 4000 g zentrifugiert.

Während der Zentrifugation wurde die Substratlösung gemäß der Anleitung aus dem Abschnitt 2.1.5 vorbereitet. Diese wurde an jedem Messtag frisch angesetzt.

Nach der Zentrifugation befand sich das Trypsin im Überstand, aus dem direkt oder ab einer gewissen Larvengröße verdünnt die benötigte Menge für die Enzymaktivitätsbestimmung entnommen werden konnte. Abbildung 15 gibt eine Übersicht über die Prozessschritte von der Messung der Wachstumsparameter bis zu der Messung der Trypsinaktivität.

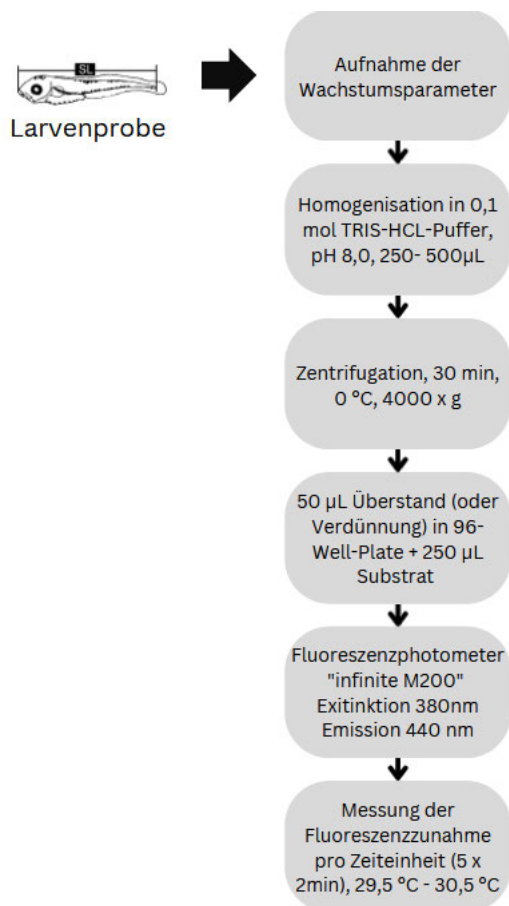


Abbildung 15 Darstellung der Prozessschritte

Aufgelistet sind die einzelnen Schritte des Prozesses von der Aufnahme der Wachstumsparameter der Larve bis zur Messung der Trypsinaktivität am Fluoreszenzphotometer. Modifiziert nach (Ueberschär, 1993).

## Material und Methoden

### 2.5.4 Fluoreszenzphotometrische Messung der Enzymaktivität

Für die Messung wurden 50 µL des Überstandes des zentrifugierten Larvenhomogenates, wie in den Layouts in Tabelle 12 dargestellt, in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Bei größeren Larven, bei denen eine hohe Trypsinaktivität erwartet wurde, wurde der abgenommene Überstand 1:2 oder 1:5 mit TRIS-Puffer vorverdünnt.

Zum Start der Reaktion wurden jeweils 250 µL des Substrats BZ-L-Arg-MCA zur Probe hinzugefügt und durch die Schüttelfunktion des Messgerätes vermischt. Da der Substratumsatz direkt beginnt, wenn das Substrat hinzugegeben wird, musste zügig pipettiert und anschließend direkt gemessen werden. Gemessen wurde der Anstieg der Fluoreszenz in fünf Intervallen von jeweils zwei Minuten.

Die Messparameter und Aktivitätsdaten werden vom Tecan Fluoreszenzphotometer in einer Excel-Tabelle festgehalten. Die Inkubationstemperatur betrug als Kompromiss zwischen hoher Umsatzgeschwindigkeit und Schutz vor Denaturierung der Enzyme zwischen 29,5 °C und 30,5 °C. Die Messungen wurden bei einem pH-Wert von 8,0 durchgeführt.

*Tabelle 12 Beispiel für ein Pipettierlayout für die 96-Well Mikrotiterplatte für die Messung von Proben.*

*Das P ist eine Abkürzung für Probe; die Nummer dahinter bezieht sich auf die Probennummer, mit der zurückverfolgt werden kann, welche Larve in diesem Well gemessen wird. Wie in der Tabelle 11 stehen die grau hinterlegten Felder für die Messung des Blankwertes (TRIS) oder nicht gemessene Wells.*

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	TRIS	P10	P22	P34	P46	P58	P70	P82
2	TRIS	P11	P23	P35	P47	P59	P71	P83
3	TRIS	P12	P24	P36	P48	P60	P72	P84
4	P1	P13	P25	P37	P49	P61	P73	P85
5	P2	P14	P26	P38	P50	P62	P74	P86
6	P3	P15	P27	P39	P51	P63	P75	P87
7	P4	P16	P28	P40	P52	P64	P76	P88
8	P5	P17	P29	P41	P53	P65	P77	P89
9	P6	P18	P30	P42	P54	P66	P78	P90
10	P7	P19	P31	P43	P55	P67	P79	
11	P8	P20	P32	P44	P56	P68	P80	
12	P9	P21	P33	P45	P57	P69	P81	

## 2.6 Statistische Analyse

Für die Analyse wurden die erhobenen Daten im Tabellenkalkulationsprogramm Excel zusammengeführt und aufbereitet. Über dieses Programm wurden ebenfalls die Tabellen und Diagramme erstellt und das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet.

Die weitere statistische Auswertung erfolgte mittels „RStudio“. Ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) in den Daten wurde in RStudio mittels ANOVA (mixed-model) festgestellt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Mortalitätsrate

Die Ergebnisse der Mortalitätsbestimmung werden genutzt, um festzustellen, welche der Treatments zu welchem Zeitpunkt die höchste Sterblichkeit haben, und welches Treatment allgemein zu einem besseren Überleben der Larven beigetragen hat.

In Abbildung 16 sind die akkumulativen Mortalitätsraten und gemittelten Mortalitätsraten der toten Larven für den Tag für das jeweilige Fütterungsregime dargestellt. Eine Aufteilung in die einzelnen Treatments ist im Anhang (Abschnitt 8.3) zu finden. Zu Beginn des Versuches an 4 dph gibt es höhere Mortalitäten, welche über die drauf folgenden Tage abnehmen und ab 7 dph wieder steigen. Es ist zu erkennen, dass der Zeitraum von Tag 7 bis Tag 24 die höchsten Mortalitäten bei allen Treatments aufweist. Dabei haben die Treatments 2 und 4 einen zeitlich versetzten Peak, welcher bei beiden geringer ist, als beim Kontrolltreatment und Treatment 3. Im Zeitraum der Artemienfütterung (18 – 32 dph) zeigt sich zusätzlich, dass die Treatments, welche Artemien erhalten haben (Kontrolltreatment und Treatment 2) die geringsten Mortalitäten in diesem Zeitraum aufweisen. Gegen Ende des Versuchszeitraumes (44 dph – 56 dph) gibt es einen Anstieg der Mortalitäten in Treatment 2, welcher bei den anderen Gruppen nicht vorhanden ist. Die meisten Verluste konzentrieren sich jedoch auf das erste Drittel des Versuches, in dem das Lebendfutter verfüttert wurde.

In der Abbildung 16 sind zwei auffällige Anstiege in den Werten vorhanden: Zum einen der Anstieg in den Mortalitäten an 10 dph beim Kontrolltreatment und der Anstieg von 24 dph bis 27 dph im Treatment 2.

## Ergebnisse

In Tabelle 13 sind die Gesamtmortalitäten in allen vier Replikaten, die Gesamtmortalitäten in den Treatments, der Mittelwert und die Standardabweichung aufgezeigt. Es wurde für die Gesamtmortalität ein signifikanter Unterschied zwischen der Treatmentgruppe 2 zum Treatment 3 festgestellt und ein deutlicher Unterschied zu den Treatments 1 und 4 (nach der Korrektur).

*Tabelle 13 Übersicht über die gesamten Mortalitätsraten für alle Treatments.*

*Für alle Treatments wurde ebenfalls eine Gesamtsumme, der Mittelwert zwischen den Tanks des selben Treatments und der Standardabweichung davon erstellt. In dieser Tabelle wurde ebenfalls eine theoretisch angenommene Mortalität („Korrektur“) von Treatment 4 ohne den technischen Fehler berücksichtigt. Die Berücksichtigung basiert auf Annahmen und Vergleichen der restlichen Tanks des selben Treatments.*

Treatment	Summe	Gesamt	Mittelwert	Std. Abw.
1	1953			
1	2003			
1	1743			
1	1909	7608.00	1902.00	97.64
2	1626			
2	1712			
2	1257			
2	1457	6052.00	1513.00	173.96
3	2130			
3	1968			
3	1681			
3	2087	7866.00	1966.50	175.19
4	1988			
4	2077			
4	2109			
4	1812	7986.00	1996.50	115.38
4 Korrektur	1526	7435	1858.75	219.23

# Ergebnisse

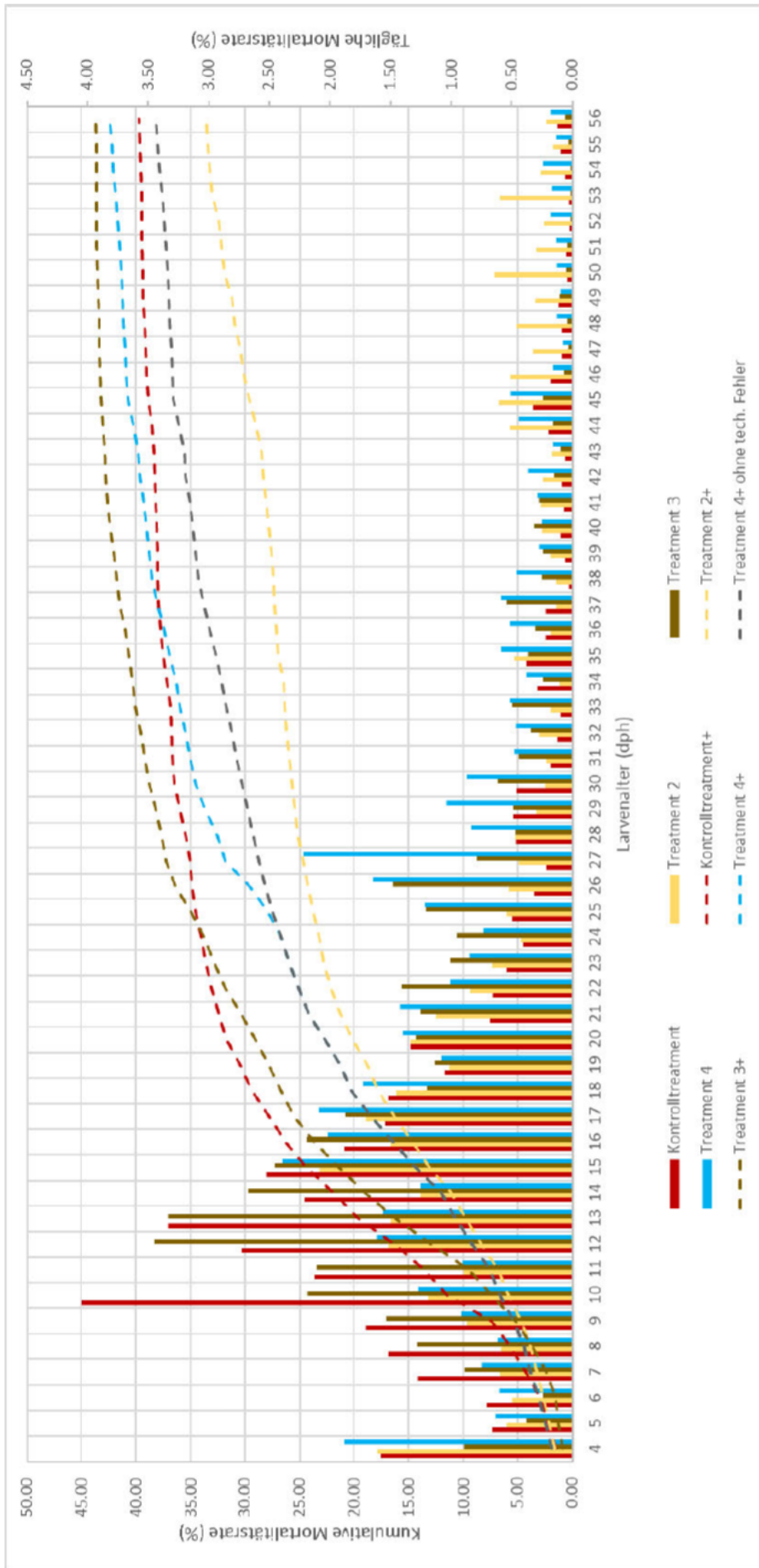


Abbildung 16 Darstellung der relativen kumulativen Mortalitätsrate gegen das Larvenalter und Darstellung der gemittelten relativen Tagesmortalitäten eines Treatments gegen das Larvenalter (dph) während des gesamten Versuchszeitraums.

Die Anzahl der Larven zu Beginn des Versuchs betrug theoretisch 4500 pro Tank bzw. 18000 pro Treatment. Für das Treatment 4 wurde für den Zeitraum ab 24 dph bis zum Versuchsende eine spekulative Kurve für eine theoretisch angenommene Mortalität erstellt. Diese Kurve berücksichtigt den technischen Ausfall nicht. Für die durch den Ausfall beeinträchtigten Tage wurden Mortalitätswerte angenommen, welche zu den Beobachtungen der restlichen Tanks in Treatment 4 passen. Die Treatments als einzelne Darstellungen können im Anhang gefunden werden

Ergebnisse

## **3.2 Wachstumsdaten**

### **3.2.1 Längen- und Höhenwachstum**

Im Zeitraum während der Anpassung an die neuen Umgebungsbedingungen (2 dph bis 4 dph) und bis zur ersten Probenentnahme (6 dph) zeigt sich in Abbildung 17, dass die Goldbrassenlarven ähnlich gewachsen sind. In diesem Zeitraum weist das Kontrolltreatment die geringste durchschnittliche Größe auf.

Im Zeitraum von 9 dph bis 18 dph weisen die Treatments 2 und 4 das beste Wachstum auf, mit signifikanten Unterschieden zum Kontrolltreatment. Zum Zeitpunkt von 18 dph sind keine signifikanten Unterschiede beim Längenwachstum zwischen den Treatments mehr zu erkennen. Das Längenwachstum erreicht bei allen Treatments eine ähnliche Größe.

Das Treatment 3 ist jedoch schon am Tag 21 signifikant kleiner als die anderen Treatments. Treatment 2 erreicht an Tag 27 ein signifikant größeres Wachstum, zu allen Gruppen, wobei das Kontrolltreatment zu diesem Zeitpunkt größtmäßig an zweiter Stelle kommt. Dies hält sich bis Tag 30.

Ab Tag 32 wird wieder eine Tendenz des Auseinanderwachsens der einzelnen Gruppen ersichtlich. Auch scheint ab hier die Kontrollgruppe einen stärkeren Wachstumsschub zu erhalten. Von diesem Tag an bis Tag 40 besteht nur ein signifikanter Größenunterschied zwischen Treatment 2 und Treatment 4.

Ab Tag 40 sind die Larven des Kontrolltreatments durchschnittlich länger, als die Larven der restlichen Gruppen, wobei der Unterschied zu den Gruppen 3 und 4 signifikant größer ist.

## Ergebnisse

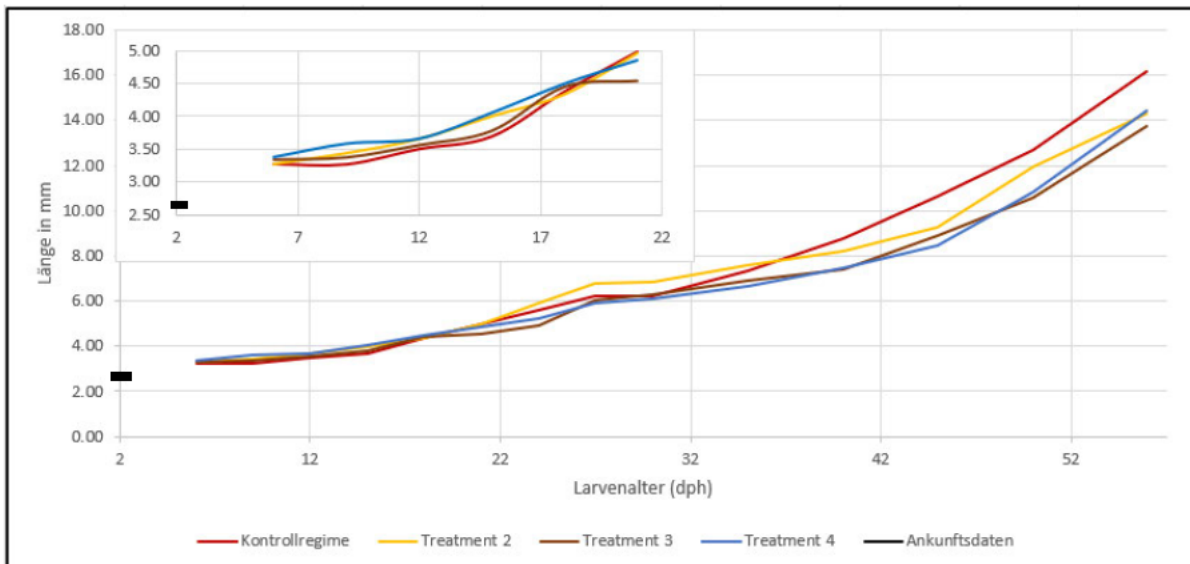


Abbildung 17 Darstellung des Längenwachstums für die vier verschiedenen Treatments und der Ausgangswert der Larvenlänge zum Zeitpunkt der Ankunft am Fraunhofer Institut in Büsum („Ankunftsdaten“) gegen das Larvenalter (dph).

Die dargestellten Werte wurden aus den Mittelwerten der Proben der vier Aufzuchtanks des jeweiligen Treatments an dem Tag berechnet. Als Ausgangswert für die Bestimmung des Längenwachstums wurden die Längen bei der Ankunft der Larven am Fraunhofer Institut in Büsum bestimmt. Die Kontrollgruppe hat am Ende des Versuches im Durchschnitt die längsten Larven, mit einem signifikanten Unterschied, zu den anderen Treatments ( $p < 0,05$ ).

Am Ende des Versuches zeigt die Kontrollgruppe die höchste Zunahme beim Längenwachstum mit durchschnittlich 16,16 mm. Dieser Unterschied ist signifikant zu den übrigen Treatments. Das zweitbeste Längenwachstum zeigt Treatment 4 mit durchschnittlich 14,43 mm, dicht gefolgt von Treatment 2 mit 14,32 mm und abschließend Treatment 3 mit 13,74 mm. Dies ist in Abbildung 17 veranschaulicht.

Die Betrachtung des Höhenwachstums in Abbildung 18 zeigt zu Beginn von 6 dph eine höhere Differenz zwischen den einzelnen Treatments, als das Längenwachstum.

Erst ab 35 dph zeigen die Daten eine Tendenz zur Trennung in zwei Gruppen: die Gruppe der Kontrolle und des Treatments 2, welche eher ein besseres Höhenwachstum zeigen; und die Gruppe der Treatments 3 und 4, welche ein vergleichsweise schlechteres Höhenwachstum zeigen. Beide dieser Gruppen bleiben bis zum Ende des Versuches bestehen, jedoch wächst Treatment 4 gegen Ende leicht besser als Treatment 3.



## Ergebnisse

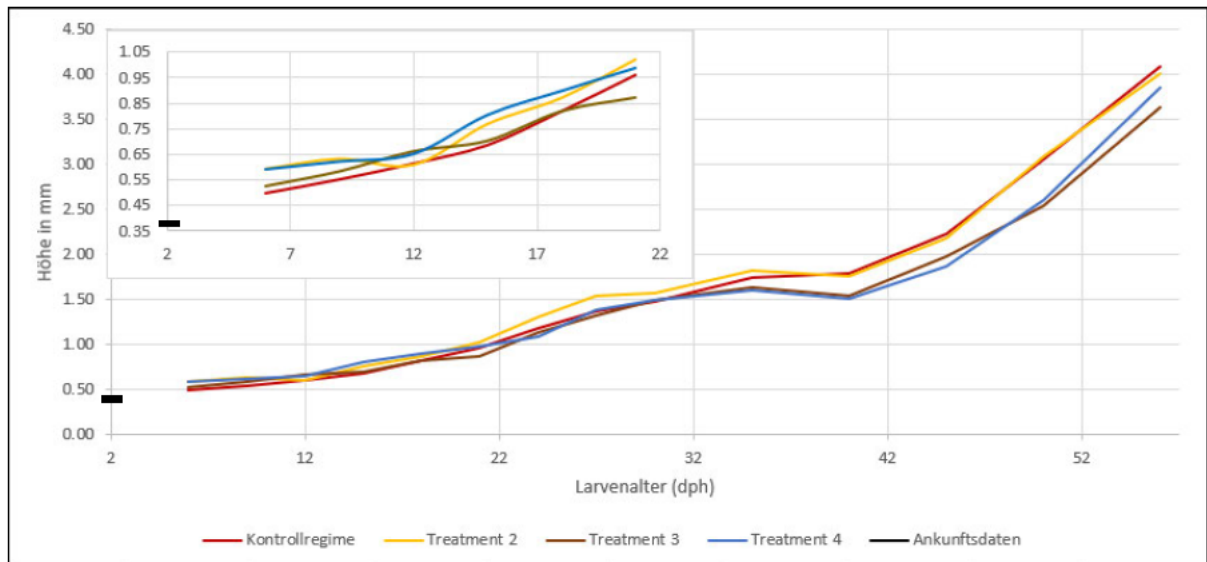


Abbildung 18 Darstellung des Höhenwachstums der Fütterungsregime und der Ausgangswert der Larvenhöhe zum Zeitpunkt der Ankunft am Fraunhofer Institut in Büsum („Ankunftsdaten“) gegen das Larvenalter (dph).

Die dargestellten Werte wurden aus den Mittelwerten der Proben der vier Aufzuchtanks des jeweiligen Treatments an dem Tag der jeweiligen Probennahme entnommen. Unter dem Punkt „Ankunftsdaten“ ist der Ausgangswert der Höhe zum Zeitpunkt der Ankunft der Laven am Fraunhofer Institut in Büsum zu finden. Es ist zu erkennen, dass das Kontrollregime und das Treatment 2 am Ende des Versuches im Durchschnitt die höchsten Larven hervorgebracht hat. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Treatments gefunden.

Die Kontrollgruppe erreichte ein durchschnittliches Höhenwachstum von 4,08 mm, Treatment 2 folgte mit 4,02 mm, Treatment 4 erreichte eine durchschnittliche Höhe von 3,86 mm und das Schlusslicht bildete Treatment 3 mit 3,63 mm. Diese Unterschiede sind nicht signifikant. Das Höhenwachstum über die Zeit ist in Abbildung 18 veranschaulicht.

## Ergebnisse

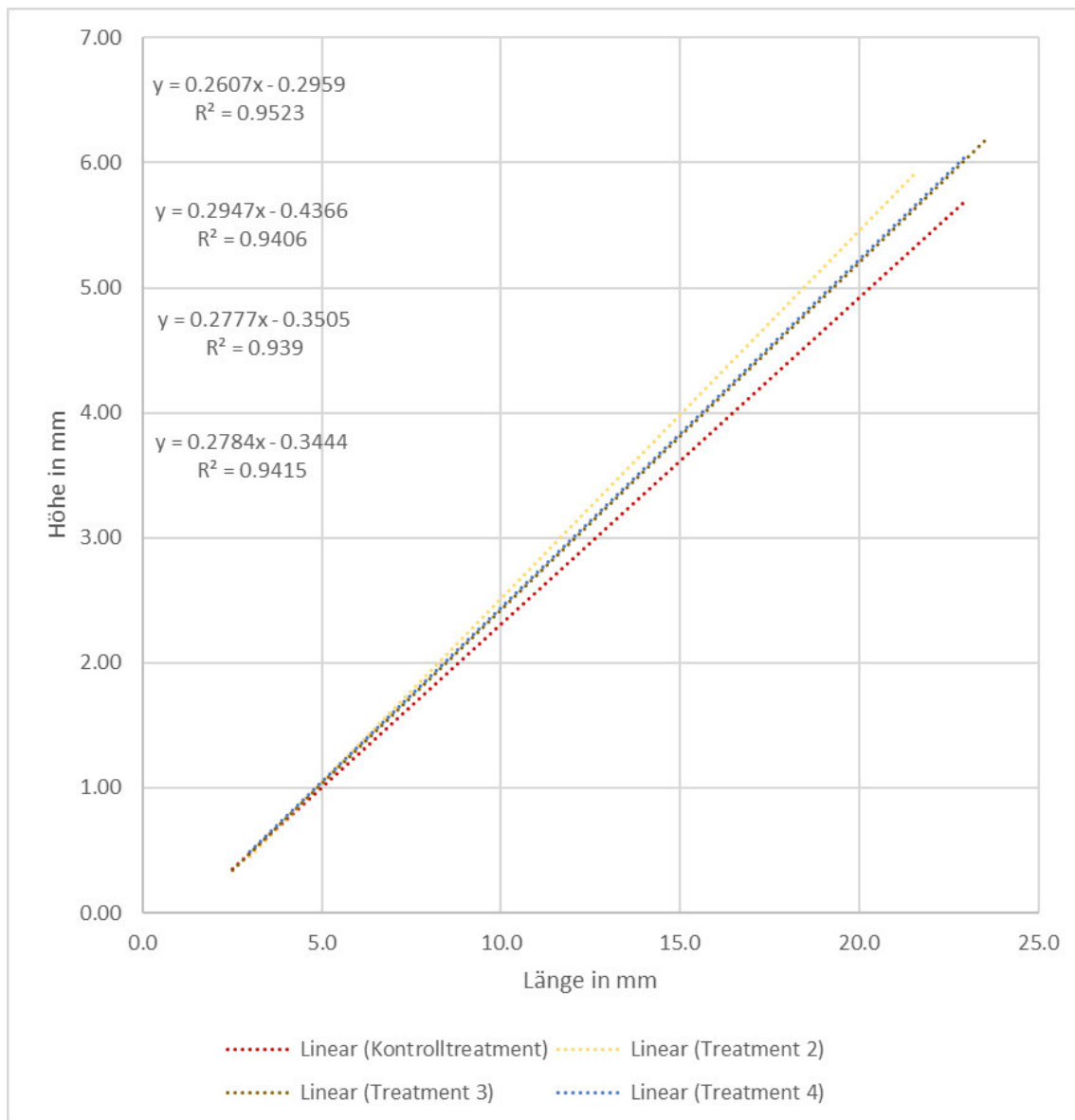


Abbildung 19 Darstellung der Trendlinien der Treatments von der Auftragung des Larvenhöhe in Millimeter gegen die Larvenlänge in Millimeter.

Die Trendlinien wurden mit einer linearen Funktion erstellt. Diese stellen den interpolierten Verlauf der Daten dar. Die Funktionen der Trendlinien sind links in der Abbildung zu finden. Die Gleichungen wurden anhand der Treatmentnummer sortiert.

In Abbildung 19 wird das Verhältnis der Larvenhöhe gegen die Larvenlänge mit linearen Trendlinien dargestellt. Diese zeigen, dass die Larven mit zunehmender Länge ein stärkeres Höhenwachstum aufweisen. Dabei zeigt sich, dass Treatment 2 bei geringerer Länge eine größere Höhe aufweist, als die restlichen Treatments. Die Treatments 3 und 4 haben einen ähnlichen Verlauf. Das Kontrolltreatment weist bei derselben Länge wie die zu vergleichenden Treatments die geringste Höhe auf. Das Wachstum der Larven ist eher isometrisch.

## Ergebnisse

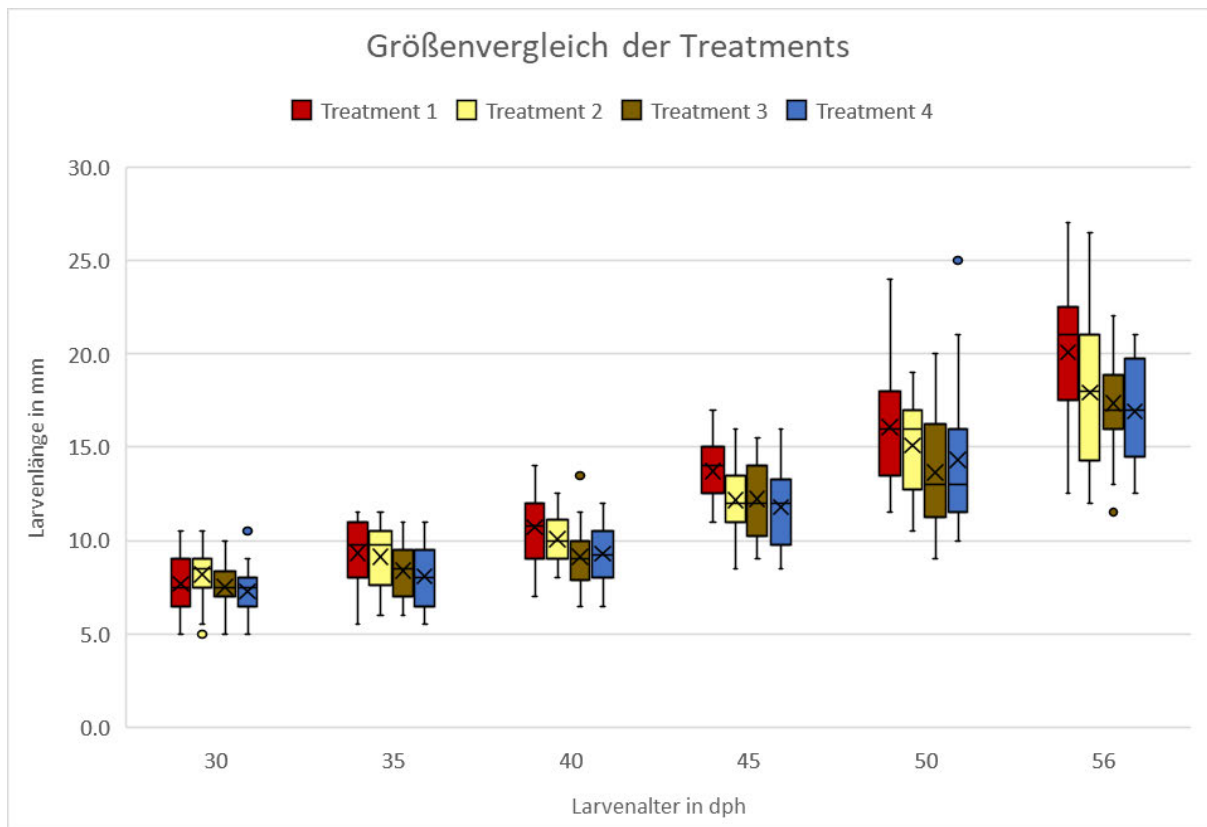


Abbildung 20 Darstellung des Vergleiches der Larvenlängen der verschiedenen Treatments in Millimetern gegen das Larvenalter in dph als Kastengrafik.

Dargestellt sind die Larvengrößen von 30 dph bis 56 dph. Der Median der Werte wird durch ein horizontales Strich und der Mittelwert als Kreuz markiert. Die Whisker markieren den äußersten Wert innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands und damit die maximalen und minimalen Larvenlängen, welche nicht als Ausreißer betrachtet werden.

Zum Vergleich der Larvenlängen in den verschiedenen Treatments und zur Überprüfung auf Unterschiede in der Larvengröße innerhalb eines Treatments, welche Kannibalismus begünstigen würde, wurde in Abbildung 20 die Larvenlänge in Millimeter gegen das Larvenalter von 30 dph bis 56 dph als Kastengrafik dargestellt. Zu erkennen ist, dass mit zunehmendem Larvenalter die Spannweite der Larvenlänge zunimmt. Dabei zeigen das Kontrolltreatment und Treatment 2 die größte Streuung in der Larvenlänge.

Ergebnisse

### 3.2.2 Trockengewicht

Das Trockengewicht der einzelnen Treatments zeigt zu Beginn des Versuches (6 dph bis 12 dph) keine signifikanten Unterschiede. Erst ab 15 dph zeigt sich Treatment 4 durch eine starke Gewichtszunahme signifikant größer als das Kontrolltreatment. Dieser Unterschied ist an Tag 18 nicht mehr zu sehen. An 21 dph hat Treatment 2 das höchste Trockengewicht, welches an 24 dph einen signifikanten Unterschied zu allen anderen Gruppen ausmacht. Dies hält sich bis 35 dph, an welchem das Kontrolltreatment sich dem Treatment 2 angenähert hat. Die Gruppen 3 und 4 haben einen ähnlichen Gewichtsabstand zu Treatment 2 gehalten zu den Vortagen und haben noch immer signifikant weniger Gewicht, als das führende Treatment.

Das Trockengewicht der Kontrollgruppe an 40 dph liegt signifikant über den Treatments 3 und 4; die Treatmentgruppe 2 hat ein geringeres Trockengewicht, als die Kontrollgruppe und keine signifikanten Unterscheide mehr zu den Gruppen 3 und 4. Diese Verteilung hält sich bis 50 dph, an dem die Treatments 1 und 2 ein ähnliches Gewicht und Treatments 3 und 4 keine signifikanten Unterscheide mehr aufweisen.

Das Trockengewicht zeigt am Ende der Aufzucht (56 dph) einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den Rotatorienttreatments und einen deutlichen, aber nicht signifikanten Unterschied zwischen dem Kontrolltreatment und Treatment 4. Das Kontrolltreatment erreichte das durchschnittlich höchste Trockengewicht mit 18,24 mg, mit Abstand gefolgt von Treatment 2 mit 14,32 mg, Treatment 4 mit 13,56 mg und Treatment 3 mit 11,52 mg. Trotz dieser sichtbaren Unterschiede, war die Gewichtszunahme bis Tag 35 unter den einzelnen Treatments ähnlich. Veranschaulicht ist dies in Abbildung 21.

## Ergebnisse

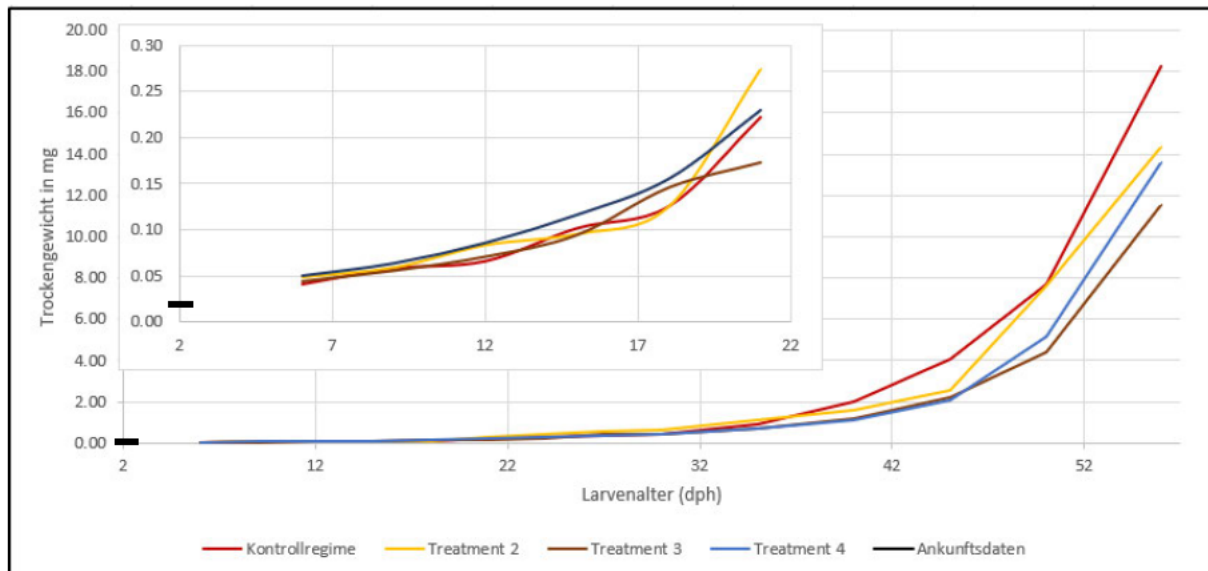


Abbildung 21 Auftragung der Trockengewichte der einzelnen Treatments und Ausgangswert des Larvengewichts zum Zeitpunkt der Ankunft am Fraunhofer Institut in Büsum („Ankunftsdaten“) gegen das Larvenalter (dph).

Die dargestellten Werte wurden aus den Mittelwerten der Aufzuchtanks zum jeweiligen Tag entnommen. Es wurde auch das gemittelte Gewicht zum Zeitpunkt der Ankunft der Larven am Fraunhofer Institut in Büsum berücksichtigt und ist unter dem Punkt „Ankunftsdaten“ zu finden. Diese Daten werden als Ausgangswert berücksichtigt. Das höchste Gewicht hatte am Ende des Versuches die Kontrollgruppe. Dieser Unterschied zu den anderen Treatments ist signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Treatments 2, 3 und 4 lagen alle vergleichsweise näher beieinander als das zweitbeste Treatment (2) zur Kontrollgruppe.

In Abbildung 22 ist das Larvengewicht gegen die Larvenlänge aufgetragen und in die einzelnen Treatments unterteilt. In der Abbildung zeigt sich, dass in allen Treatments das Gewicht nicht proportional mit der Länge zunimmt, sondern dass der Verlauf von Gewicht zu Länge exponentiell verläuft.

# Ergebnisse

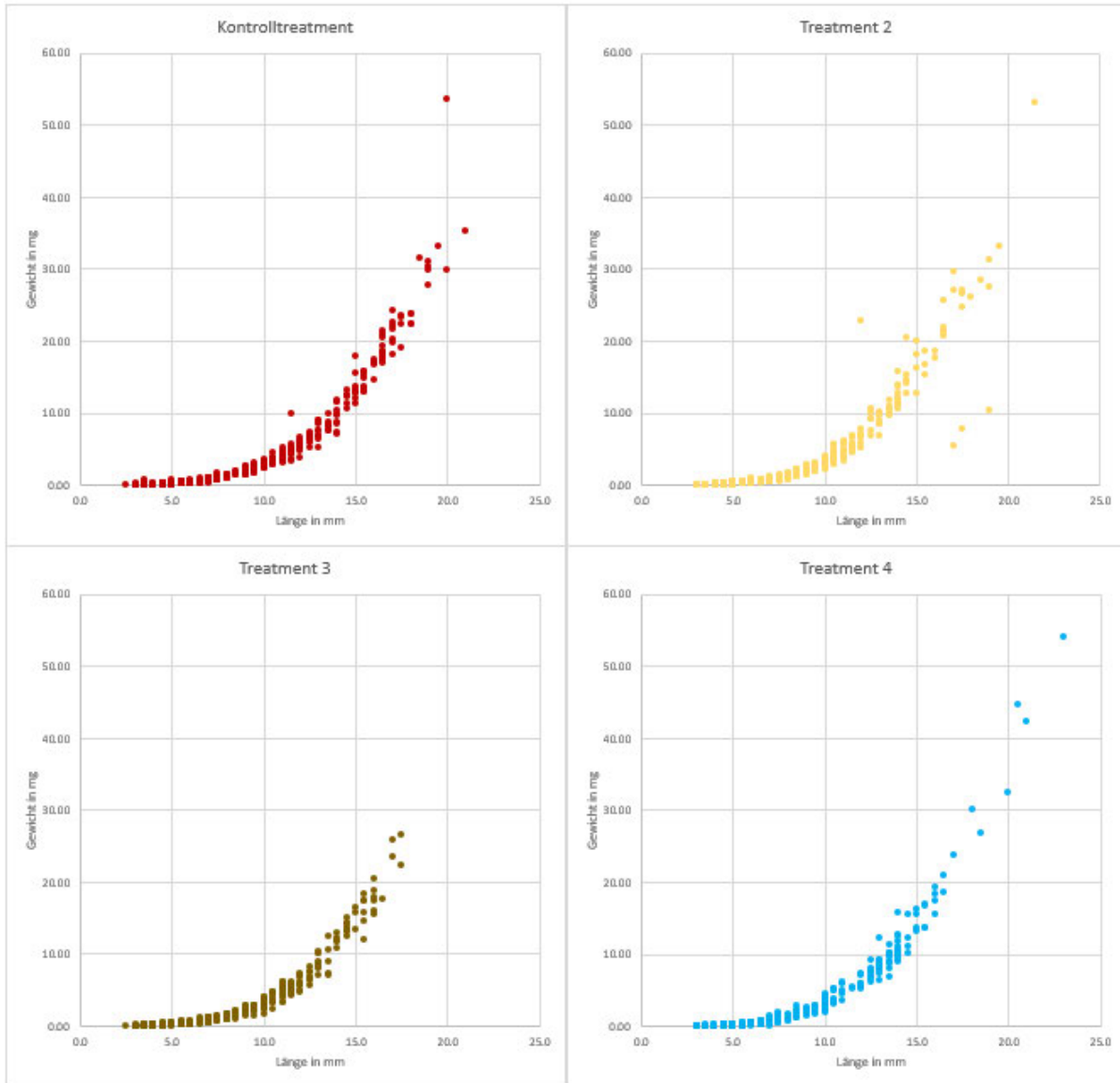


Abbildung 22 Darstellung des Larvengewichtes in Milligramm gegen die Larvenlänge in Millimeter der einzelnen Treatments.

## Ergebnisse

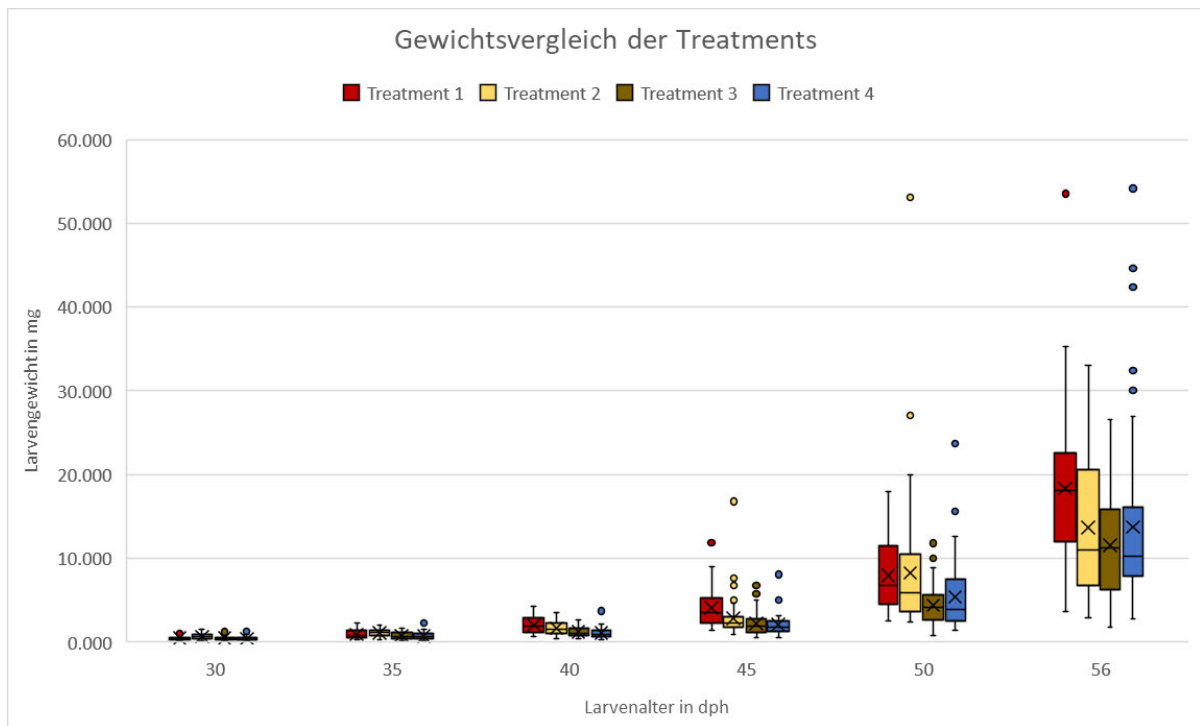


Abbildung 23 Darstellung des Vergleiches der Trockengewichte der Larven der verschiedenen Treatments in Milligramm gegen das Larvenalter in dph als Kastengrafik.

Dargestellt ist das Larventrockengewicht im Zeitraum von 30 dph bis 56 dph. Der Median der Werte wird durch ein horizontales Strich und der Mittelwert als Kreuz markiert. Die Whisker markieren den äußersten Wert innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands und damit die maximalen und minimalen Larvenlängen, welche nicht als Ausreißer betrachtet werden.

In Abbildung 23 ist das Trockengewicht der einzelnen Treatments im Vergleich zu einander als Kastengrafik dargestellt. Dabei wird nur das Larvenalter von 30 – 56 dph betrachtet. Zu erkennen ist, dass mit zunehmendem Larvenalter die Streuung des Larvengewichtes zunimmt. Dabei zeigen das Kontrolltreatment und Treatment 2 die größte Streuung.

## Ergebnisse

### 3.3 Trypsinaktivität

#### 3.3.1 Kalibrierung und Trypsinstandardkurve

Die Trypsinstandardkurve (Abbildung 24) und die MCA-Eichkurve (Abbildung 25) wurden jeweils mit der in 2.5 beschriebenen Methode erstellt.

Wie in Abbildung 24 zu sehen, ist die Standardkurve eine lineare Zunahme der Trypsinaktivität mit zunehmender Trypsinkonzentration. Die Standardkurve wird neben der Linearitätsprüfung auch zur Kontrolle der technischen Eigenschaften des Fluoreszenzphotometers verwendet und in regelmäßigen Abständen neu erstellt.

Die MCA-Eichkurve dient der Proportionalitätsprüfung des fluorimetrischen Messverfahrens. Die Steigung der Eichkurve dient der Umrechnung der gemessenen Fluoreszenz der Larvenproben in eine äquivalente Trypsinaktivität.

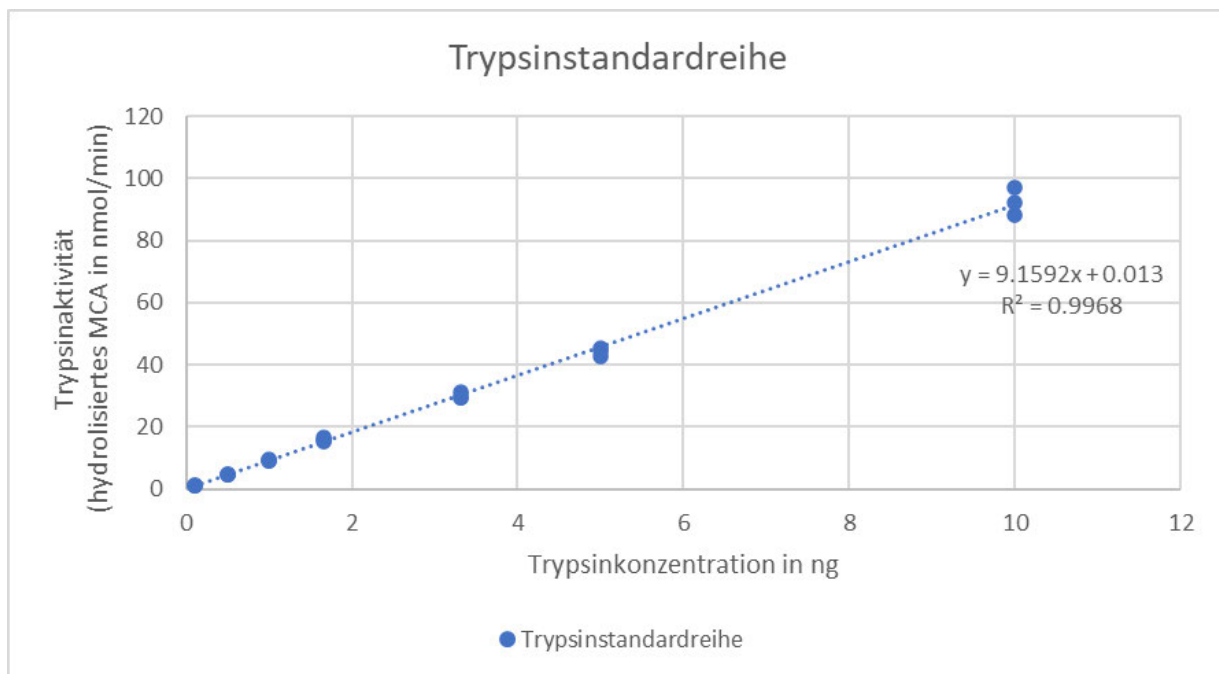


Abbildung 24 Verwendete Trypsinstandardkurve mit 1:250 Trypsin aus Schweinepankreas von SERVA.

Die Messpunkte repräsentieren die gemittelten Aktivitätssteigerungen (Triplicate) pro Messintervall, nach einer Minute. Die Standardkurve zeigt den linearen Verlauf in Abhängigkeit von der Trypsinkonzentration. Die gemessenen Konzentrationen betragen 0,10 ng; 0,50 ng; 1,00 ng; 1,66 ng; 3,32 ng; 5,00 ng und 10,00 ng.



## Ergebnisse

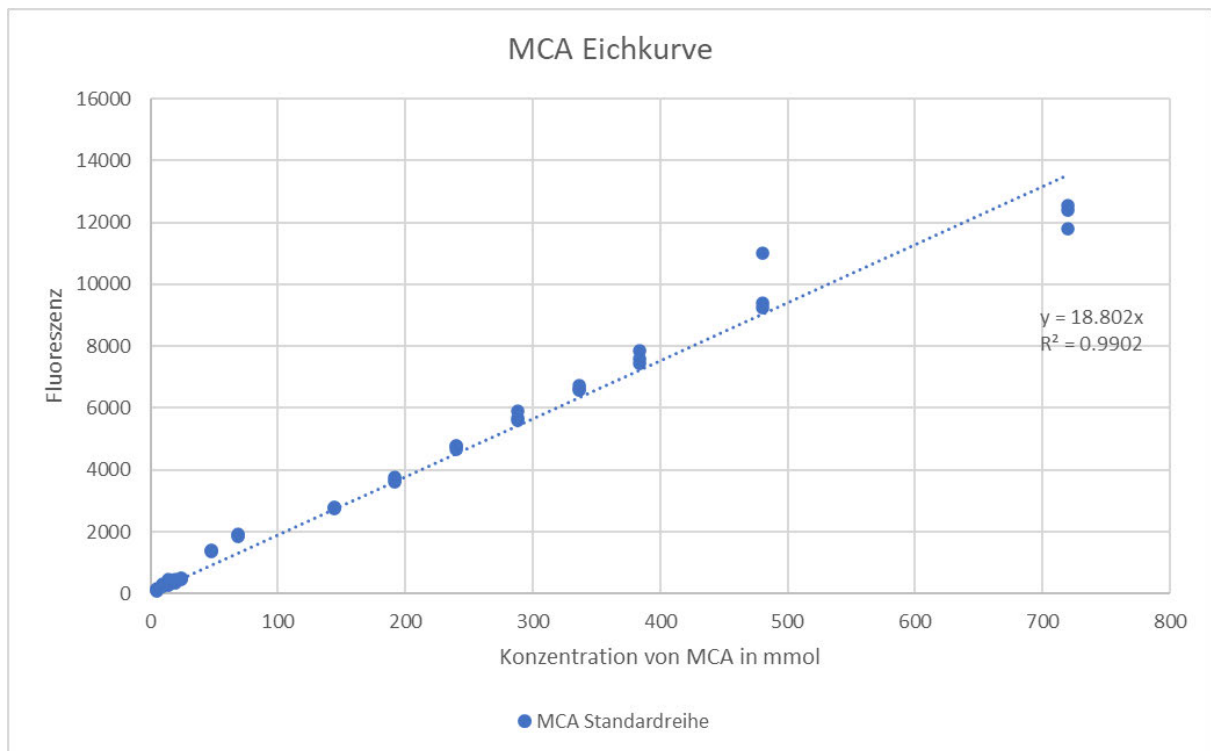


Abbildung 25 Eichkurve mit MCA von Bachem.

Die Punkte repräsentieren die gemittelten Fluoreszenzwerte Triplikaten mit je fünf Messwerten. Die Eichkurve dient neben der Berechnungsgrundlage für die Umrechnung der gemessenen Fluoreszenz in die umgesetzte Menge an Na-Benzoyl-L-Arginin-4-Methylcoumarinyl-7-Amid auch der Proportionalitätsprüfung. Die gemessenen Konzentrationen betragen 4,80 mmol, 9,60 mmol, 14,40 mmol, 19,20 mmol, 24,00 mmol, 48,00 mmol, 69,00 mmol, 144,00 mmol, 192,00 mmol, 240,00 mmol, 288,00 mmol, 336,00 mmol, 384,00 mmol, 480,00 mmol und 720,00 mmol.

### 3.3.2 Ergebnisse der Trypsinaktivität

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Trypsinaktivitätsmessungen in den Fischlarven aus den verschiedenen Treatments dargestellt. In den Abbildungen Abbildung 27 bis Abbildung 32 sind die gemittelten Trypsinaktivitäten in den verschiedenen Treatments gegen das Larvenalter in dph aufgetragen. Dabei wurden zwei verschiedene Darstellungsweisen gewählt: lineare Darstellung über den gesamten Versuchszeitraum und die lineare Darstellung während der Lebendfutterverfütterungsphase. In den Abbildungen sind die Fütterungszeiträume der Artemia und der Rotatorien- und Copepodenfütterung eingetragen, um die direkten Auswirkungen dieser Fütterungen aus den Grafiken entnehmen zu können.

Die Abbildung 26 gibt eine Erklärung über die verwendeten Markierungen zur Veranschaulichung der Fütterungszeiträume.

## Ergebnisse

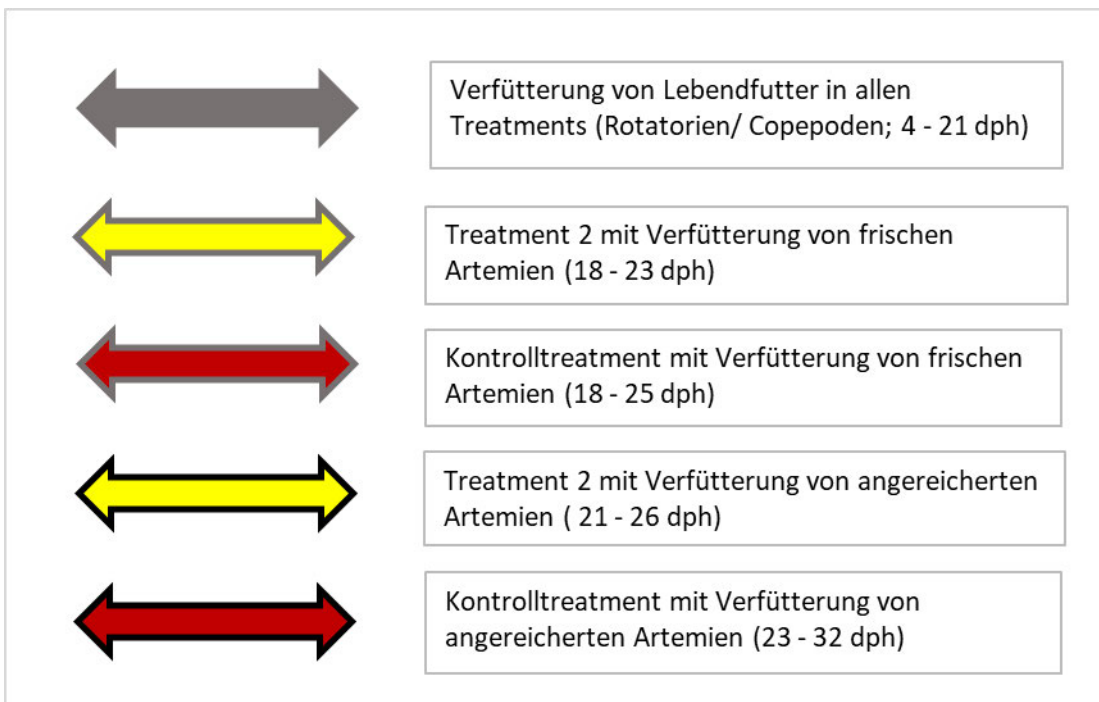


Abbildung 26 Legende der Pfeile für die Abbildungen der gemessenen Trypsinaktivität gegen das Larvenalter.

Die Pfeile stellen die Verfütterungszeiträume der einzelnen Lebendfuttervarianten dar. Die Zeiträume der Rotatorien- und Copepodenverfütterung sind aufgrund der zeitlichen Überschneidung zusammengefasst worden und stehen für die Verfütterung von diesen Lebendfuttern in allen Treatments (Kontrolltreatment, Treatment 2, Treatment 3 und Treatment 4).

In Abbildung 27 ist die Trypsinaktivität über den gesamten Versuchszeitraum dargestellt. In dieser Abbildung liegen die Kurven der einzelnen Treatments zunächst vergleichsweise nah beieinander, mit Treatment 1 und 2 bis 40 dph über den anderen Treatments liegend.

Ab Tag 45 steigt die Trypsinaktivität von Treatment 2 stark an und ist ab seinem Peak an 50 dph signifikant größer zu den Treatments 3 und 4. Beim Kontrolltreatment zeigt sich auch ein starker Anstieg an 50 dph, jedoch ist dieser weder signifikant größer noch kleiner zu einer anderen Gruppe.

Der Unterschied der Aktivitäten von Treatment 3 und 4 an 50 dph ist vergleichsweise gering zur Trypsinaktivität an Tag 45. Am Ende des Versuchszeitraumes waren keine signifikanten Unterschiede bei der Trypsinaktivität zwischen den Treatments zu erkennen.

## Ergebnisse

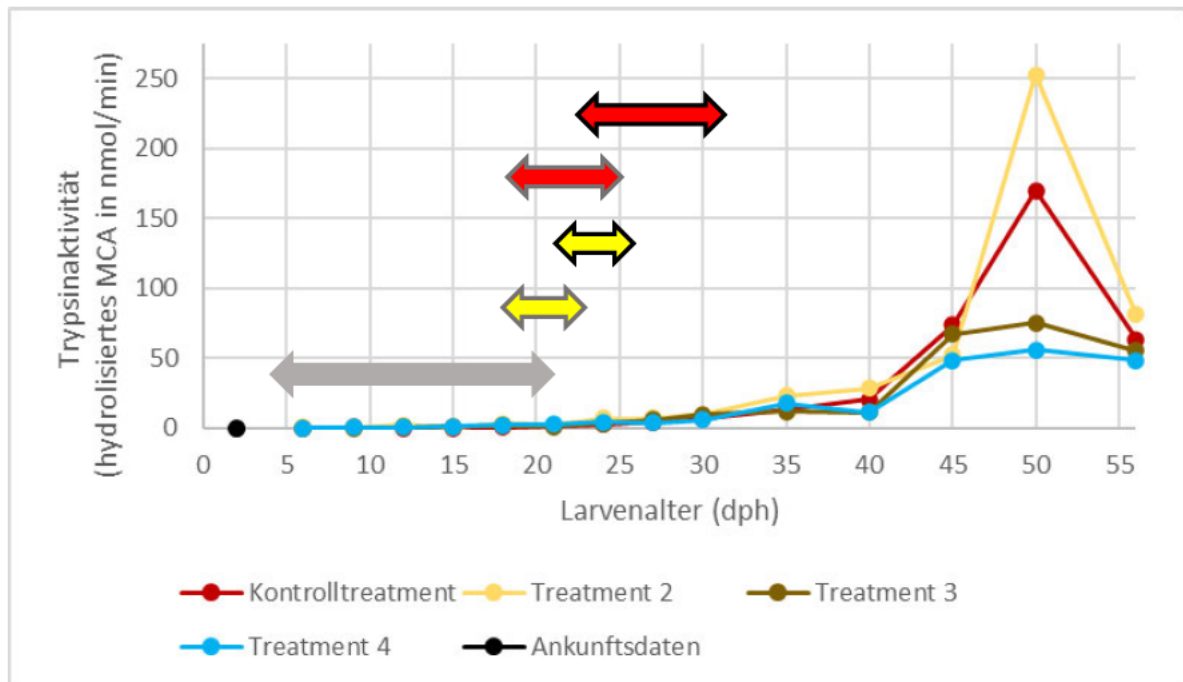


Abbildung 27 Darstellung der gemittelten Trypsinaktivität über den gesamte Versuchszeitraum gegen das Larvenalter von 0 – 56 dph.

Die lineare Skalierung über den gesamten Versuchszeitraum wurde gewählt, da sie eine klare Übersicht über die Trypsinaktivität zum Vergleich der Treatments gibt. Markiert in der Abbildung sind die Zeitpunkte der Verfütterung von Artemia-Nauplien und angereicherten Artemien, sowie der Zeitraum der Verfütterung von Rotatorien und Copepoden. Eine Legende zu den Pfeilen ist in Abbildung 26 zu finden.

In Abbildung 28 ist die Trypsinaktivität über den Zeitraum von 0 bis 35 dph dargestellt, um die Entwicklung der Trypsinaktivität und die direkten Auswirkungen des Lebendfutters genauer betrachten können.

In der Abbildung ist am auffälligsten, dass Treatment 2 eine stärkere Schwankung in der Trypsinaktivität zu den einzelnen Tagen aufweist. Die Werte der Trypsinaktivität in Treatment 2 liegen zum einen Teil über allen anderen Treatments und zum anderen Teil auf demselben Level wie das Treatment 4 oder drunter.

Die Steigung in der Aktivität ist besonders hoch, nachdem in diesem Treatment die Verfütterung der angereicherten Artemien begonnen hat (21 dph auf 24 dph). Der Unterschied in der Trypsinaktivität in dieser Abbildung des Treatments 2 ist jedoch nur an Tag 24 zum Kontrolltreatment und an Tag 35 zum Treatment 4 signifikant.

In den beiden Treatments 1 (Kontrolltreatment) und 3 zeigt sich, wie in Treatment 2, ebenfalls ein starker Anstieg in der Trypsinaktivität ab 21 dph. Das Treatment 3 erreicht an 30 dph eine Trypsinaktivität ähnlich zu Treatment 2, welches davor die größte Aktivität gezeigt hatte.

## Ergebnisse

Bei der nächsten Probennahme zeigt das Treatment 3 jedoch die geringste Trypsinaktivität. Es bestehen am Ende der Verfütterung von Copepoden und Rotatorien keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

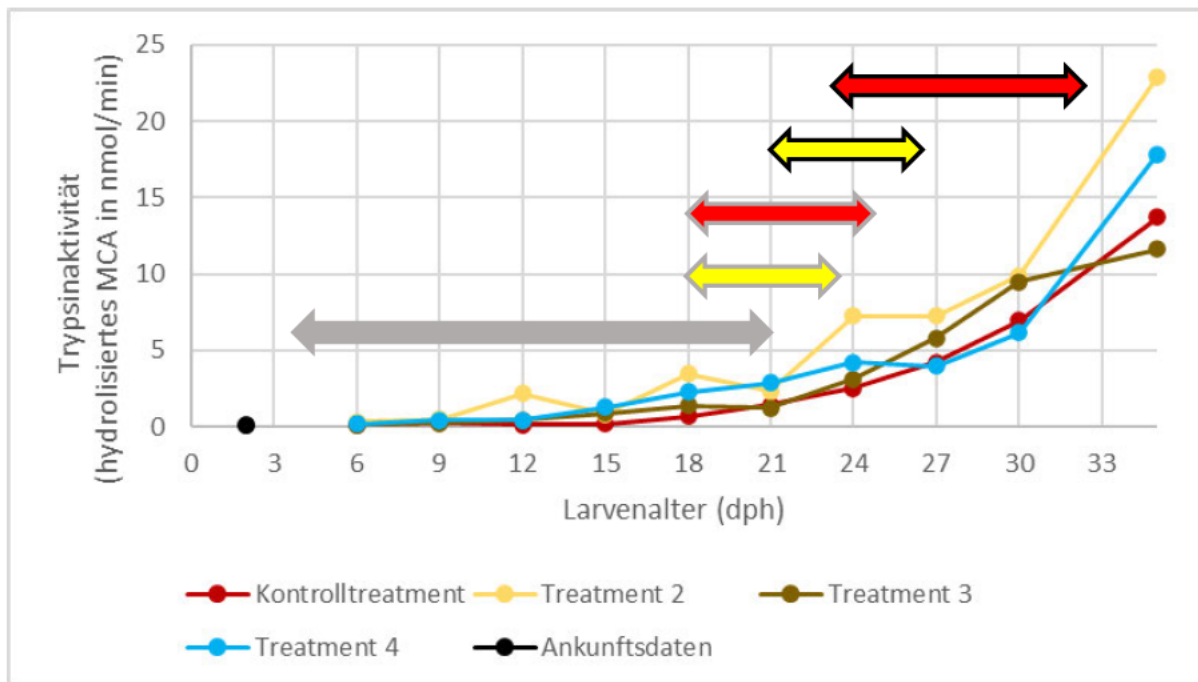


Abbildung 28 Darstellung der gemittelten Trypsinaktivität der verschiedenen Treatments nach Larvenalter (dph) mit den Ankunftsdaten (0 dph bis 35 dph).

Markiert in der Abbildung sind die Zeitpunkte der Verfütterung von *Artemia*-Nauplien und angereicherten Artemien, sowie der Zeitraum der Verfütterung von Rotatorien und Copepoden. Eine Legende zu den Pfeilen ist in Abbildung 26 zu finden.

Bei Betrachtung der durchschnittlichen Trypsinaktivität pro Tag zeigt sich in der ersten Hälfte des Versuches eine auffällige Schwankung der Trypsinaktivität in Treatment 2 (Abbildung 28), im Vergleich zu den Schwankungen der anderen Treatments.

Bei der Analyse der Rohdaten in einer Kastengrafik (Abbildung 29) zeigten sich bei Treatment 2 insbesondere an 12 dph mehrere auffällige Werte, welche außerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands lagen und so als Ausreißer markiert worden sind.

## Ergebnisse

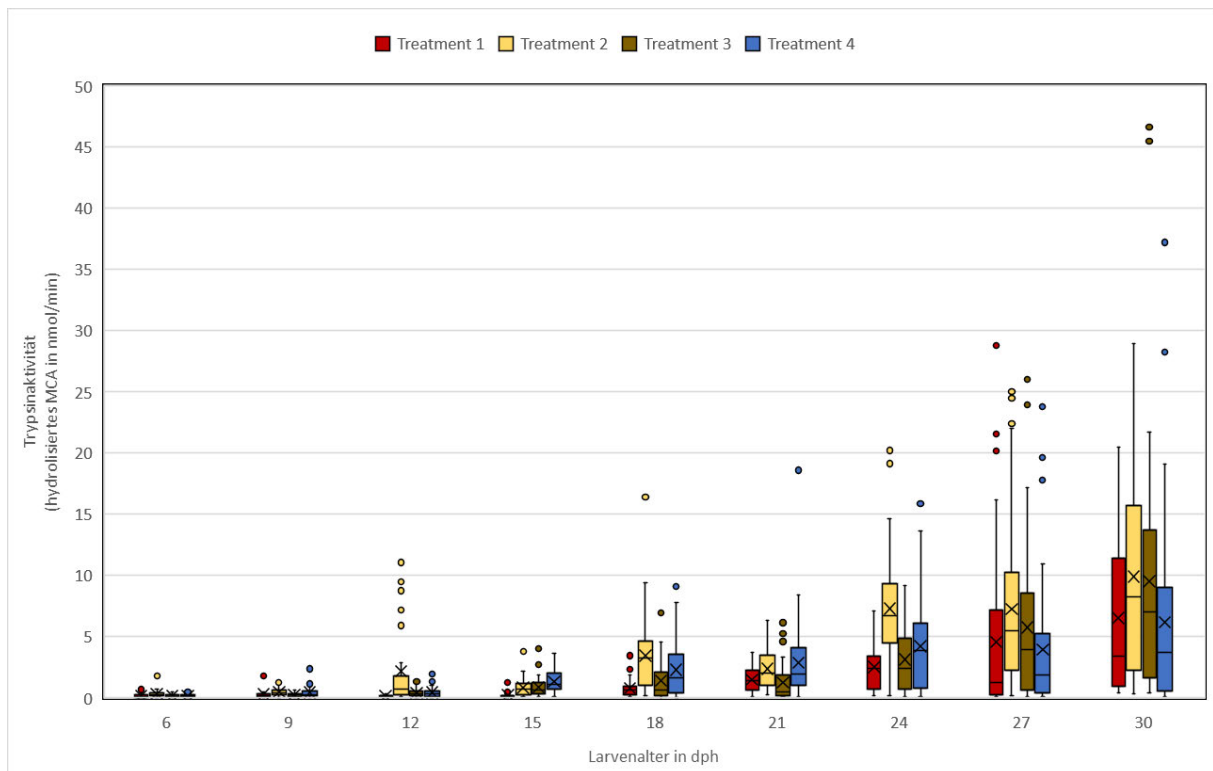


Abbildung 29 Darstellung der Trypsinaktivität (hydrolysiertes MCA in nmol/min) aller Treatments gegen das Larvenalter in days post hatching als Kastengrafik.

Dargestellt ist die Trypsinaktivität in den Tagen von 6 bis 30 dph. Der Median der Werte wird durch ein horizontalen Strich und der Mittelwert als Kreuz markiert. Die Whisker markieren den äußersten Wert innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands und damit die maximalen und minimalen Larvenlängen, welche nicht als Ausreißer betrachtet werden.

Die Prüfung dieser Werte ergab, dass alle neun Ausreißer an diesem Tag aus demselben Tank (Tank 21) stammten. Die Trypsinaktivität von neun von zehn aus dem Tank 21 entnommenen Larven lag außerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands.

Eine grafische Veranschaulichung der Trypsinaktivitäten der einzelnen Tanks des Treatments 2 zeigte, dass die Trypsinaktivität von Tank 21 an fast allen Tagen von den Aktivitäten der anderen Tanks abwich (Abbildung 30).

Eine mögliche Erklärung dazu ist in Abschnitt 4.2.1 zu finden.

## Ergebnisse

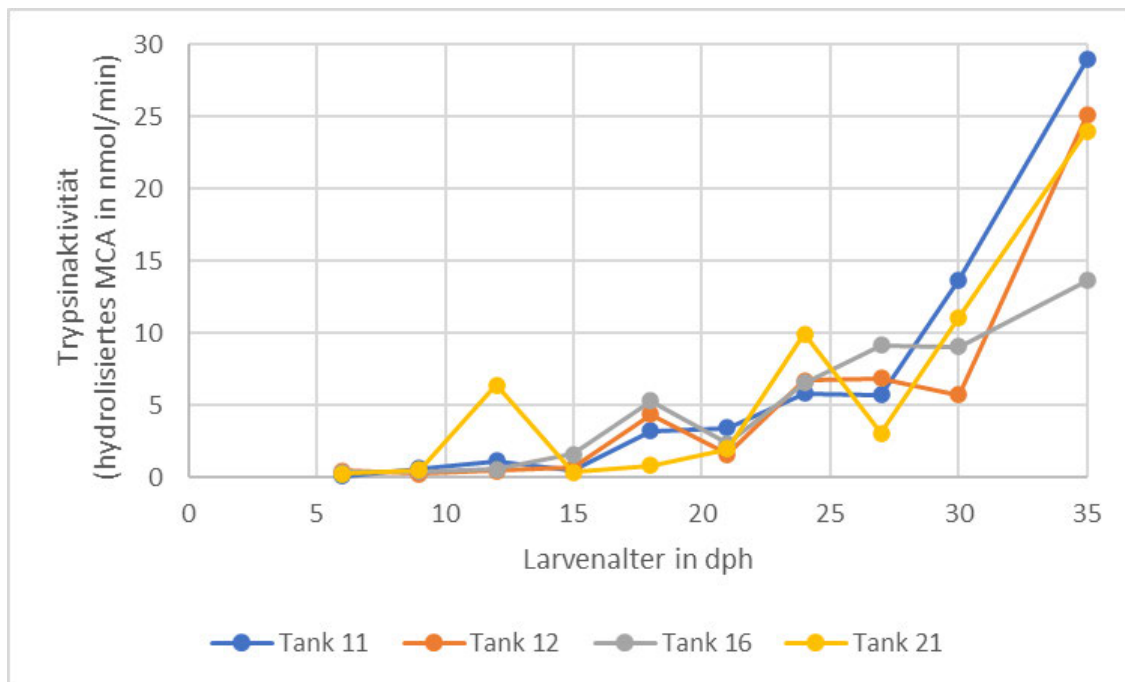


Abbildung 30 Darstellung der gemittelten Trypsinaktivität (hydrolysiertes MCA in nmol/min) der Tanks des Treatments 2 gegen das Larvenalter in dph.

Es ist zu erkennen, dass die Trypsinaktivität von Tank 21 an den meisten Tagen von den Aktivitäten der restlichen Tanks abwich, welche bis 27 dph einander ähnliche Aktivitäten zeigten. Der allgemeine Trend der Trypsinaktivität zeigt eine Steigung mit zunehmendem Alter. Dies deckt sich mit vorausgegangenen Studien. (Nolting et al., 2001; Salem et al., 2021). Auffällig zeigen sich in der Abbildung deshalb die Tage 21 und 27 dph, an denen die Trypsinaktivität aller Tanks gesunken oder auf dem selben Level des vorherigen Probenaltages blieb.

Weitere Analysen der gemessenen Trypsinaktivitätswerte ergaben, dass in jedem Treatment Streuungen der Trypsinaktivität zwischen den Tanks vorhanden sind, auch wenn diese weniger ausgeprägt sind, als in Treatment 2. Als Glättungsverfahren der Streuung der Trypsinaktivitäten zwischen den Tanks wurde eine polynomische Regression dritten Grades gewählt.

Eine Veranschaulichung der Ergebnisse mittels einer Regression wurde für die Darstellung des Gesamtzeitraumes (Abbildung 27) und für den Zeitraum von 35 – 56 dph (Abbildung 32) nicht gewählt. Begründet ist dies durch den dargestellten Zeitraum in beiden Abbildungen: Ab etwa 40 dph beginnt die Entwicklung des Magens während der Frühmetamorphose (13,7 – 18,7 mm) (Koumoundouros et al., 2008; Moyano et al., 1996).

Die Darstellung der Trypsinaktivität gegen das Larvenalter führt zu einer Vermischung von Trypsinaktivitäten von Larven verschiedener ontogenetischer Entwicklungsstände. Dies gilt für alle Stadien, da das Auseinanderwachsen schon sehr früh beginnt, wird jedoch mit zunehmendem Alter der Larven bedeutender. Das heißt, dass vermehrt mit zunehmendem Alter am gleichen Tag Trypsinaktivitäten von Larven



## Ergebnisse

betrachtet werden, bei denen die Magenentwicklung noch nicht begonnen hat (steigende Trypsinaktivität), als auch von Larven, wo dies der Fall ist (sinkende Trypsinaktivität). Dies führt zur Streuung der Daten. Die zwei gegeneinander wirkenden Trends können nicht mit einem Polynom niedrigen Grades dargestellt werden. Dies ist auch der Fall für die Darstellung der Trypsinaktivitätstrends gegen die Larvenlänge in Abbildung 34 und Abbildung 37 (Peak bei 16,0 – 19,0 mm).

In Abbildung 31 sind die gleichen Daten wie in Abbildung 28 durch eine polynomische Regression dargestellt. Es wurde eine polynomische Regression dritten Grades gewählt, da diese die Approximation des Trypsinaktivitätstrends innerhalb des Zeitraums von 0 dph bis 40 dph mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß bei allen Treatments wiedergeben kann.

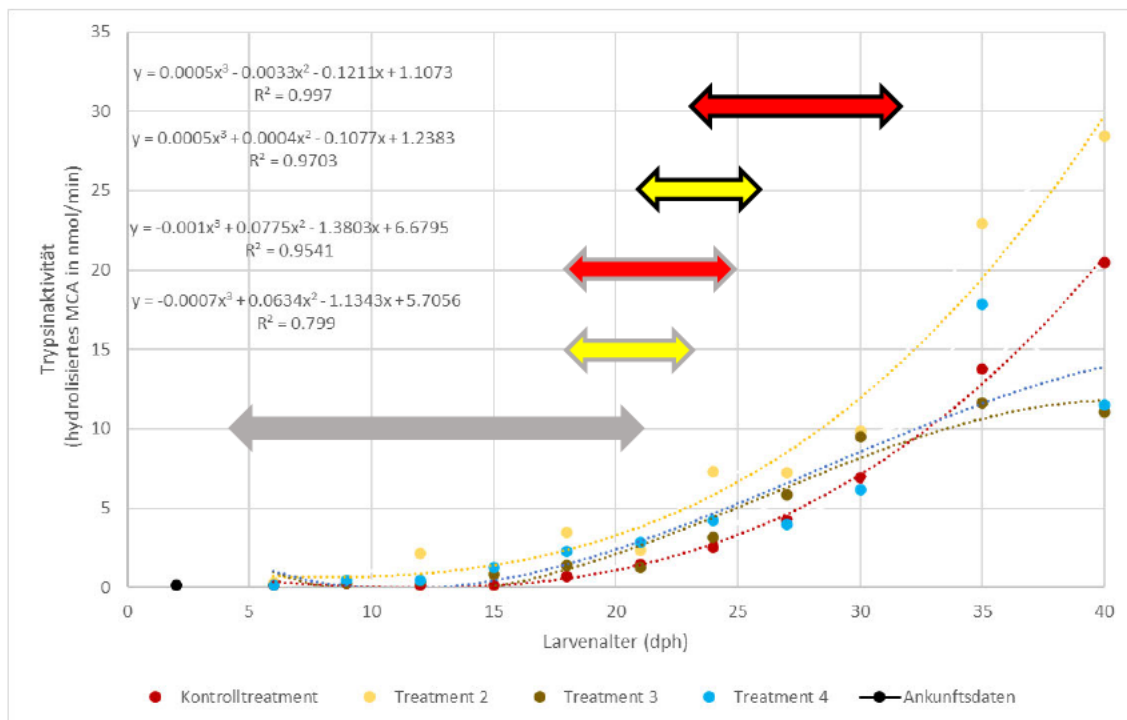


Abbildung 31 Darstellung der Trypsinaktivität (hydrolysiertes MCA in nmol/min) der verschiedenen Treatments gegen das Larvenalter (dph) mit den Ankunftsdaten (0 dph bis 40 dph).

Die Trendlinien wurden mit einer Regressionsgerade dritten Grades erstellt. Diese stellen den interpolierten Verlauf der Daten dar. Die Funktionen der Trendlinien sind links in der Abbildung zu finden. Die Gleichungen wurden anhand der Treatmentnummer sortiert. Markiert in der Abbildung sind die Zeitpunkte der Verfütterung von Artemia-Nauplien und angereicherten Artemien, sowie der Zeitraum der Verfütterung von Rotatorien und Copepoden. Eine Legende zu den Pfeilen ist in Abbildung 26 zu finden.

In Abbildung 32 ist die Trypsinaktivität im Zeitraum von 35 dph bis 56 dph dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die Trypsinaktivität der Treatments an 35 dph, 40 dph und 45 dph nur gering variiert. Die Treatments zeigen ähnliche Trypsinaktivitäten, wobei Treatment 2 bis auf an 45 dph eine leicht höhere Aktivität zeigt. Ab 45 dph steigen die

## Ergebnisse

Aktivitäten stark an und es sind deutliche Unterschiede in den Treatments zu erkennen: Treatment 2 zeigt die höchste Trypsinaktivität, gefolgt vom Kontrolltreatment. Die Treatments 3 und 4 haben eine deutlich geringere Trypsinaktivität und zeigen keinen deutlichen Maximalwert an 50 dph. Die Unterschiede in der Aktivität sind zu keinem dieser Zeitpunkte signifikant.

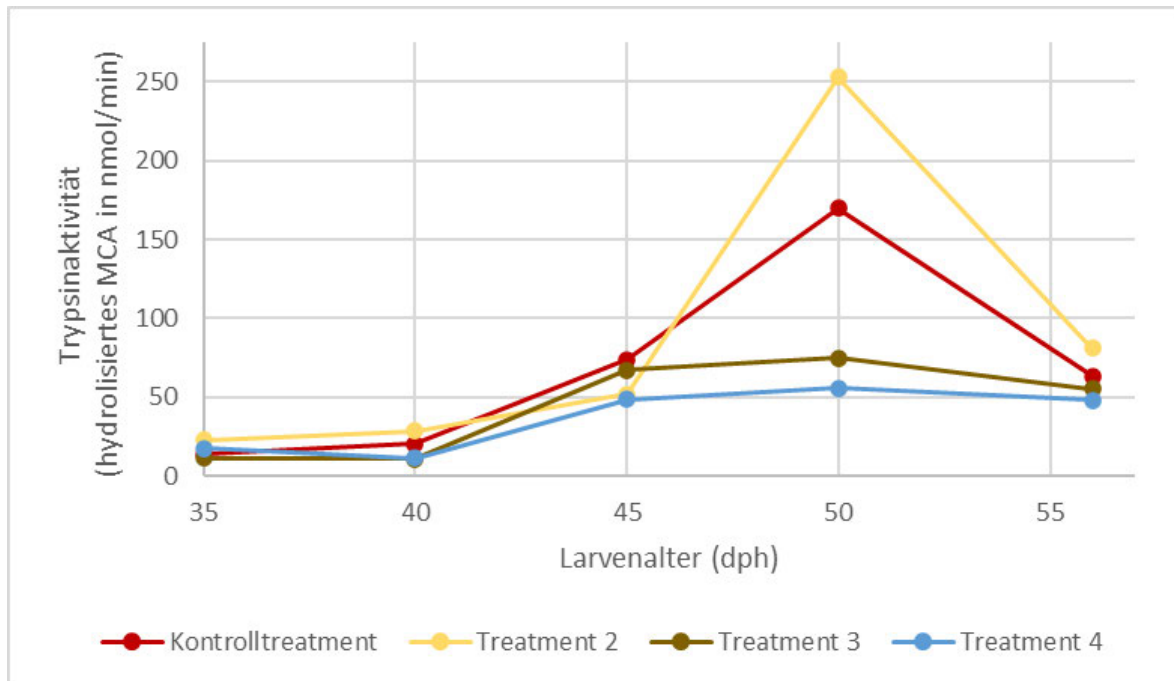


Abbildung 32 gemittelte Trypsinaktivität in den verschiedenen Treatments nach Larvenalter in dph (35 dph bis 56 dph).

In den Abbildungen Abbildung 34 bis Abbildung 37 sind die Trypsinaktivitäten pro Längengruppe dargestellt. Die Einteilung in Längengruppen wurde vorgenommen um Treatment-übergreifend Larven im selben ontogenetischen Entwicklungsstadium vergleichen zu können. Da die Messgenauigkeit bei der Längenmessung 0,5 mm betrug, wurden die Klassen anhand dieser Spannweite gebildet und innerhalb dieser Klasse das arithmetische Mittel bestimmt. Die Verdauungsenzymaktivität steigt mit der Größe (Nolting et al., 2001; Salem et al., 2021). Da Fischlarven mit zunehmendem Alter in der Länge auseinanderwachsen, werden bei der Zuordnung der Trypsinaktivität zum Alter unter Umständen verschieden große Larven verglichen. Damit können zu ermittelnde Unterschiede überlagert werden. Mit der Einteilung in Längengruppen und dem Vergleich zwischen den Treatments vergleicht man nur Larven in demselben ontogenetischen Entwicklungsstadium aus den verschiedenen Treatments.

Die Abbildung 33 gibt eine Erklärung über die verwendeten Markierungen zur Veranschaulichung der Fütterungszeiträume.



## Ergebnisse

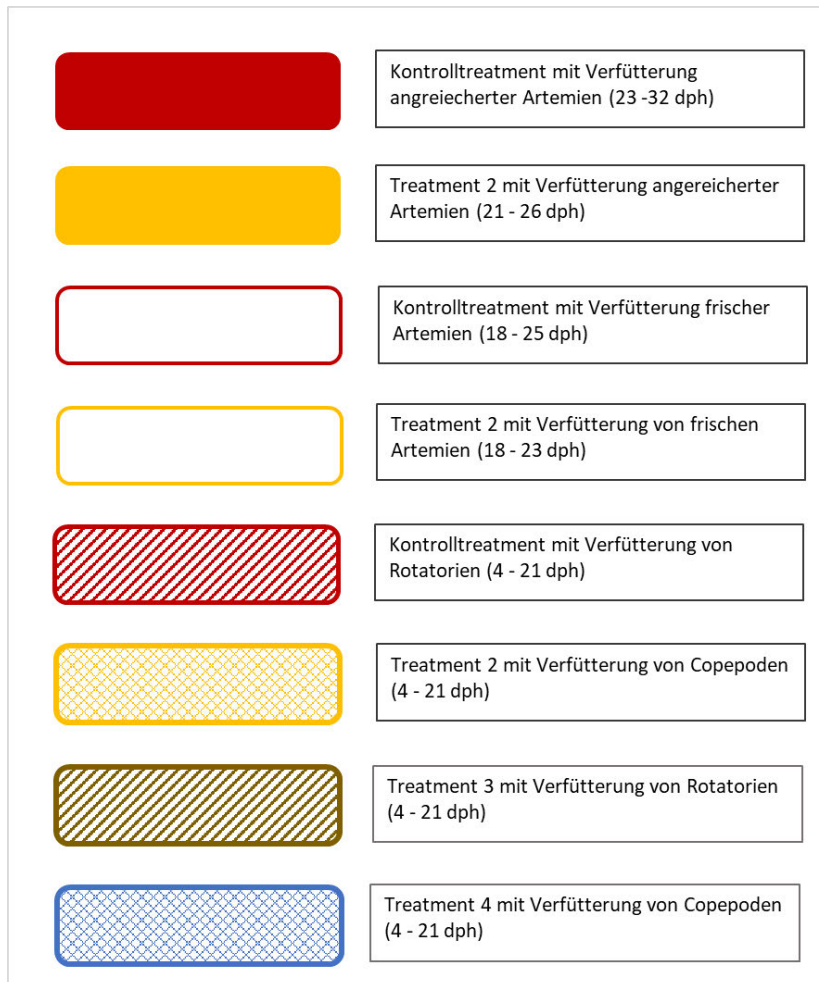


Abbildung 33 Legende der Balkenbefüllung für die Längengruppierungsdarstellung (Trypsinaktivität gegen Längengruppen).

Die Balken stellen die Verfütterungszeiträume der einzelnen Lebendfuttervarianten dar. Die Füllung der Balken repräsentiert die einzelnen Lebendfutter. Ein vollausgefüllter Balken zeigt die Verfütterung von angereicherten Artemien beim jeweiligen Treatment. Ein leerer Balken stellt die Verfütterung von frischen Artemien dar. Ein kariertes Balken zeigt die Verfütterung von Copepoden in diesem Treatment. Ein Balken mit diagonalen Streifen zeigt die Verfütterung von Rotatorien. Für die Thesenüberprüfung wurden in den Längengruppierungsdarstellungen die Zeitpunkte eingetragen, bei denen das jeweilige Lebendfutter in Bezug zum Treatment beendet wurde. Die Darstellung als Balken wurde gewählt, da zu jedem Zeitpunkt in jedem Treatment eine Spannweite an Längen in den Gruppen vorhanden war, welche durch die Balkendarstellung kenntlich gemacht werden konnte.

In der Abbildung 34 sind die gemittelten Trypsinaktivitäten der Treatments für die Längengruppen dargestellt und die Zeitpunkte eingetragen, bei denen das jeweilige Lebendfutter in Bezug zum Treatment beendet wurde. Die verschiedenen Treatments zeigen zwischen den Längengruppen schwankende Trypsinaktivitäten.

## Ergebnisse

Trotz dieser Schwankungen zeigt sich, dass Treatment 2 die höchsten Trypsinaktivitäten aufweist. Dabei ist der Unterschied von Treatment 2 zu allen Treatments in den Längengruppen von 16,1 bis 16,5 mm und 17,1 bis 17,5 mm signifikant. In den Längengruppen zwischen 16,6 mm und 17,0 mm und 18,1 mm und 18,5 mm zeigt Treatment 2 nur zu den Treatments 3 und 4 einen signifikanten Unterschied. Aufgrund geringer Datenmengen, konnte in der Längengruppe von 18,6 bis > 20,0 mm durch RStudio keine Signifikanz bestimmt werden.

Die zweithöchsten Trypsinaktivitäten zeigt das Kontrolltreatment, welches keine signifikanten Unterschiede zu den Treatments 3 und 4 aufwies.

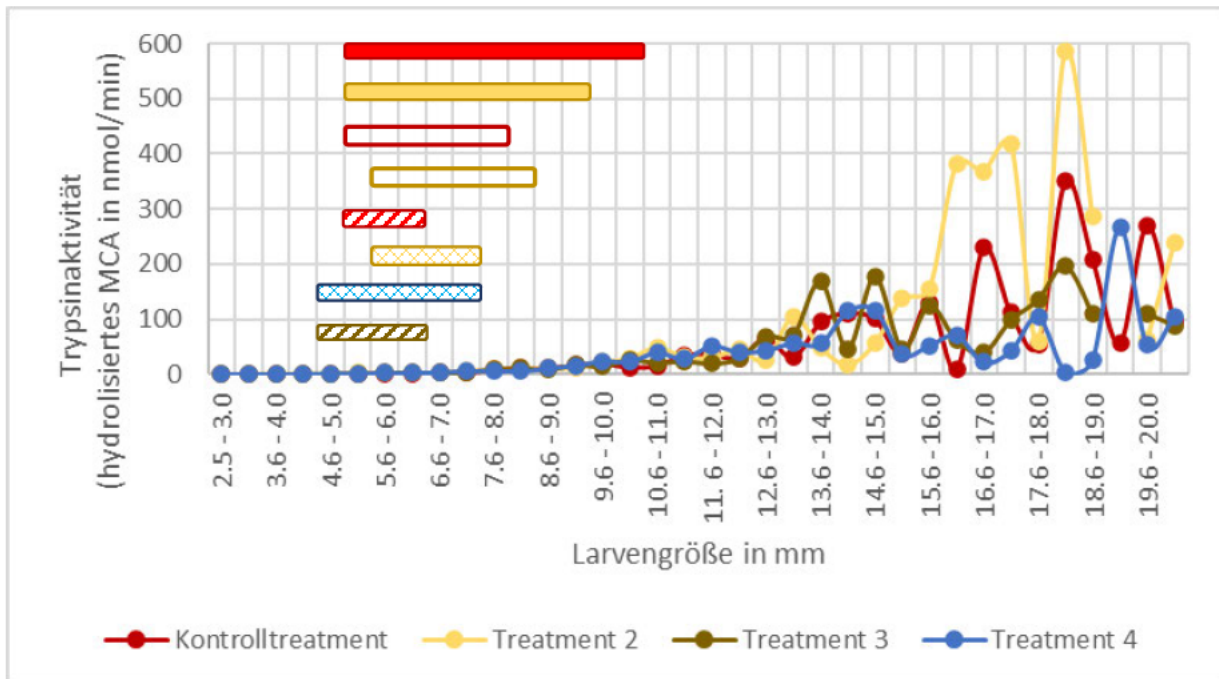


Abbildung 34 Darstellung der gemittelten Trypsinaktivitäten innerhalb der Längengruppen gegen die Larvengröße in Millimeter.

Die Balkenfarbe entspricht der Legende in der Abbildung. Eine Legende zu der Balkenbefüllung ist in Abbildung 33 zu finden.

In der Abbildung 35 sind die Kurven der verschiedenen Treatments leicht schwankend, jedoch nimmt die Aktivität mit der Länge zu. Anhand der Zeitpunkte, an denen die einzelnen Lebendfutter beendet wurden, kann eine Einordnung in das Larvenalter erfolgen.

## Ergebnisse

Es zeigt sich, dass die Längen der Larven mit zunehmenden Alter größere Varianzen haben. Dies lässt sich vor allem an den beiden Artemien-Balken der Kontrollgruppe erkennen: Der Balken der vorher beendeten Artemianauplienfütterung startet bei einer Länge ab 5,0 mm und endet bei einer Länge von 8,0 mm. Der Balken der angereicherten Artemienfütterung beginnt ebenfalls bei einer Länge ab 5,0 mm, endet jedoch bei 10,5 mm. Diese Tendenz zeigt sich auch in Abbildung 20.

Eine Tendenz zeigt sich auch in den unteren Längengruppen. Die Treatments 2 und 4 sind in den Größen zwischen 4,5 mm und 7,5 mm signifikant länger, als das Kontrolltreatment. Die Tendenz nimmt mit zunehmender Größe ab und die Treatments gleichen sich mehr an einander an.

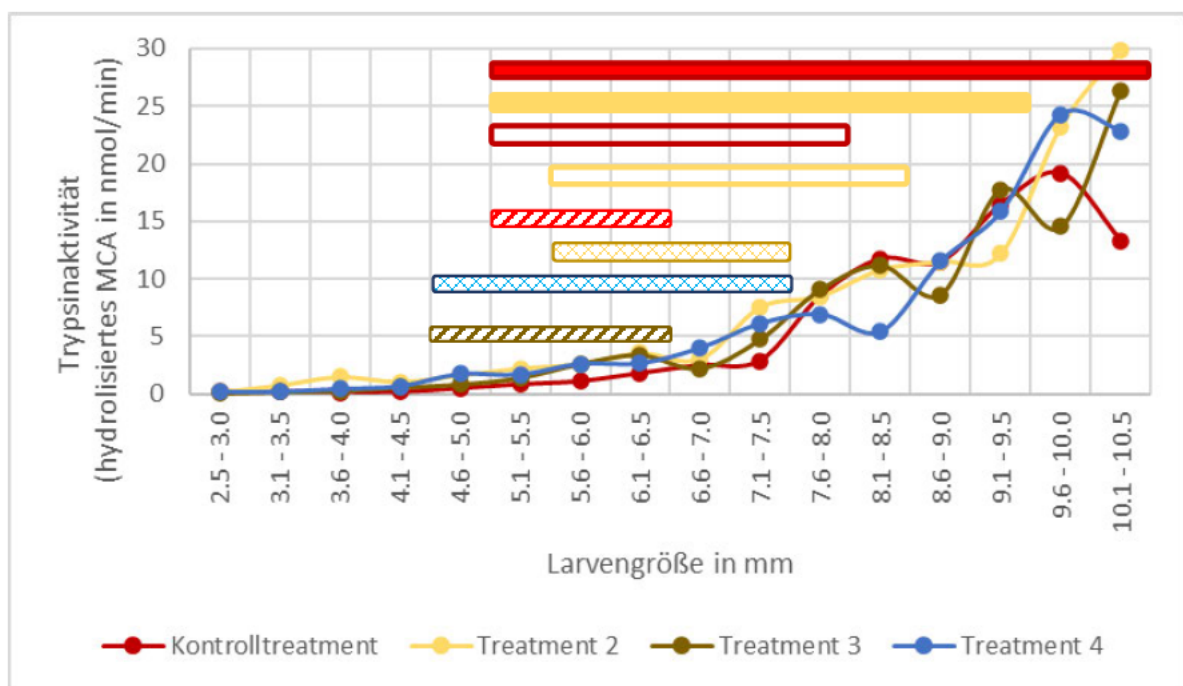


Abbildung 35 Darstellung der gemittelten Trypsinaktivität innerhalb der Längengruppen bei allen Treatments aufgetragen gegen Länge der Larven in Millimeter (2,5 – 10,5 mm).

Die Werte für die Darstellung entsprechen denen aus Abbildung 27 bis Abbildung 32, mit dem Unterschied, dass die Werte der Trypsinaktivität den Größengruppen zugeordnet und anschließend gemittelt wurden. Als Balken dargestellt, ist die Längenspanne der Larven zum Zeitpunkt, an denen der Übergang von einem Futter zum nächsten abgeschlossen wurde. Für jeden Balken wird der Abschlusstag betrachtet. Die Balkenfarbe entspricht der Legende in der Abbildung. Die Balkenbefüllung ist in Abbildung 33 zu finden.

## Ergebnisse

Die Abbildung 36 ist die Veranschaulichung der gleichen Daten aus Abbildung 35 durch eine polynomische Regression dargestellt. Es wurde eine polynomische Regression dritten Grades gewählt, da diese die Approximation des Trypsinaktivitätstrends innerhalb der Längensklassen von 2,5 mm bis 10,5 mm mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß bei allen Treatments wiedergeben kann. Die polynomische Regression wurde als Glättungsverfahren der Streuung der Trypsinaktivitäten verwendet.

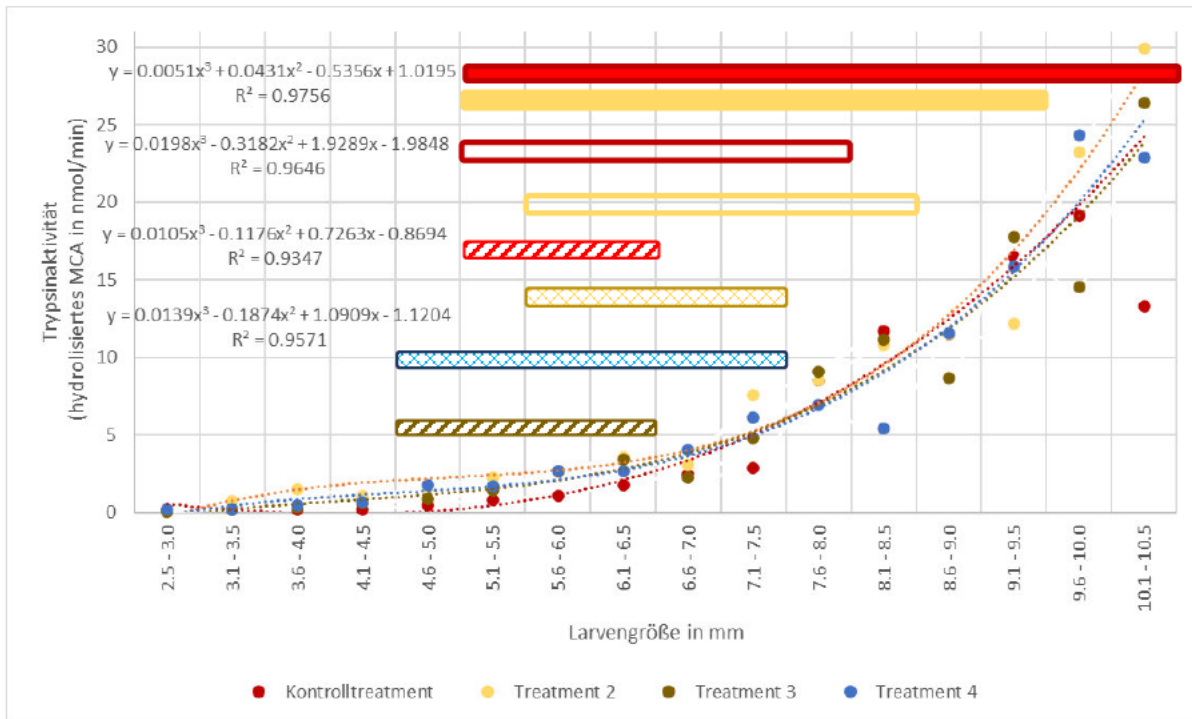


Abbildung 36 Darstellung der Trypsinaktivität (hydrolysiertes MCA in nmol/min) der verschiedenen Treatments gegen die Larvenlänge in Millimeter (2,5 – 10,5 mm).

Die Trendlinien wurden mit einer Regressionsgerade dritten Grades erstellt. Diese stellen den interpolierten Verlauf der Daten dar. Die Funktionen der Trendlinien sind links in der Abbildung zu finden. Die Gleichungen wurden anhand der Treatmentnummer sortiert. Als Balken dargestellt, ist die Längenspanne der Larven zum Zeitpunkt, an denen der Übergang von einem Futter zum nächsten abgeschlossen wurde. Für jeden Balken wird der Abschlussstag betrachtet. Die Balkenfarbe entspricht der Legende in der Abbildung. Die Balkenfarbe entspricht der Legende in der Abbildung. Eine Legende zu der Balkenbefüllung ist in Abbildung 33 zu finden.

In der Abbildung 37 sind die Trypsinaktivitäten für die Längengruppen ab 10,6 mm bis zum Ende des Experiments dargestellt. Man sieht auch hier Schwankungen in der Trypsinaktivität mit zunehmender Länge. Alle Gruppen wurden zu diesem Zeitpunkt bereits mit MD gefüttert.

In der Längengruppe zwischen 10,6 mm und 11,0 mm und 13,1 mm und 13,5 mm ist das Treatment 2 signifikant größer als das Kontrolltreatment. Zwischen diesen Längengruppen und bis zu einer Länge von 16,0 mm gibt es keine signifikante



## Ergebnisse

Unterschiede. In den Längengruppen von 16,1 mm und 16,5 mm, 17,1 mm und 17,5 mm ist das Treatment 2 signifikant größer zu allen Treatments, in der Länge zwischen 16,6 mm und 17,0 mm und 18,1 mm und 18,5 mm nur zu den Treatments 3 und 4. Aufgrund geringer Datenmengen, konnte in der Längengruppe von 18,6 bis > 20,0 mm durch RStudio keine Signifikanz bestimmt werden.

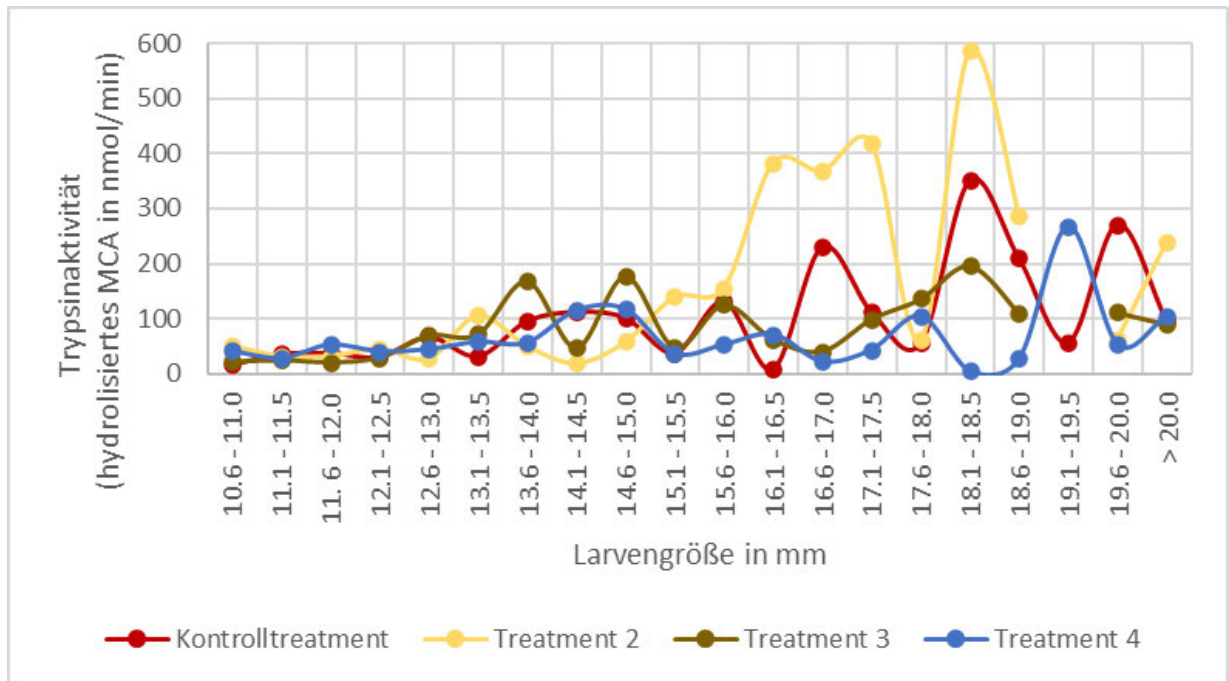


Abbildung 37 Darstellung der gemittelten Trypsinaktivität bei allen Treatments aufgetragen zur Größe der Larven in Millimeter (10,6 – 20,0 mm und > 20,0 mm).

Die Werte für die Darstellung wurden auf dieselbe Weise wie in Abbildung 27 bis Abbildung 32 erhalten, jedoch wurden die Larvengrößen gruppiert und die Aktivitätswerte in den Gruppen gemittelt. Aufgrund einer ungleichen Größenverteilung waren keine Larven in der Längenklasse 19,1 mm – 19,5 mm für die Treatments 2 und 3 vorhanden. Dadurch entstand in der Grafik in dieser Längenklasse eine Lücke.

## Diskussion

### 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 14 Rangfolge der Treatments berechnet anhand eines Punktesystems in den Kategorien Mortalitätsrate, Länge, Gewicht und Trypsinaktivität.

Das beste Treatment in der Kategorie erhält 4 Punkte, das Schlechteste 1. Das Treatment mit der höchsten Punktzahl hat die beste allgemeine Bewertung. Das Treatment mit der höchsten Punktzahl hat die beste allgemeine Bewertung. Für die Mortalitätsrate wird bei Treatment 4 der simulierte Verlauf betrachtet, welcher die Kompensierung für den technischen Fehler verwendet. Für die Kategorie der Mortalitätsrate wird die höchste Punktzahl für die geringste kumulative Mortalitätsrate gegeben.

Treatment	Mortalitätsrate	Länge	Gewicht	Trypsinaktivität	Gesamtpunktzahl	Gesamtwertung
Rang (Punkte)						
1	2	4	4	3	13	2
2	4	3	3	4	14	1
3	1	1	1	2	5	4
4	3	2	2	1	8	3

Wie in Tabelle 14 dargestellt, führten die Artemientreatments Treatment 1 und Treatment 2 in den Kategorien Länge, Gewicht und Trypsinaktivität. In der Kategorie Mortalitätsrate führten die Treatments 2 und 4. Das Treatment 3 lag in allen Kategorien bis auf Trypsinaktivität auf dem letzten Platz.

Das allgemein beste Ergebnis zeigte das Treatment 2, gefolgt vom Kontrolltreatment, Treatment 4 und zuletzt Treatment 3.

## 4. Diskussion

Um die Auswirkungen verschiedener Fütterungsregime auf die proteolytische Verdauungsenzymkapazität und insbesondere den Effekt einer Artemienfütterung bei Fischlarven von *Sparus aurata* zu untersuchen, wurde die Trypsinaktivität verschiedener Futtergruppen gemessen.

Dabei ist das Ziel dieser Arbeit gewesen, die durch die unterschiedlichen Futtermittel beeinflusste Trypsinaktivität zu quantifizieren und anhand dessen und Wachstums- und Überlebensparametern unter dem Einfluss von Artemien zu qualifizieren. Daraus sollte der Einsatz von Artemien zur Trypsinaktivitätserhöhung bewertet und Erkenntnisse zur Verbesserung der Wachstums- und Überlebensrate gezogen werden.

Diskussion

#### **4.1 Mortalitätsrate**

Neben den Rückschlüssen auf das Entwicklungsstadium, in dem sich die Goldbrassenlarven während der höchsten Mortalitäten befinden, lässt die tägliche Mortalitätsrate auch Rückschlüsse auf die spätere Überlebensrate zu und kann Wachstumsphänomene erklären. So kann beispielsweise bei einem Treatment mit besonders hohem Wachstum die Erklärung in einem frühen hohen Absterben von Larven zu finden sein: Durch das frühe Absterben der Konkurrenz, war mehr Futter für die restlichen Larven vorhanden, wodurch die Energie in das Wachstum eingebracht werden konnte statt in die Futterkonkurrenz.

Bei der Mortalitätsrate weist die Treatmentgruppe 2 die niedrigste Gesamtmortalität auf. Dieser Unterschied war signifikant ( $p < 0,05$ ) zum Treatment 3 und deutlich, jedoch nicht signifikant zu den Treatments 1 und 4. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Gesamtzahl der verstorbenen Larven des Treatments 4 manuell angepasst wurde, da eine höhere Mortalität aufgrund eines technischen Fehlers verursacht wurde (Ausfall eines Feeders). Eine Veranschaulichung ist in Abschnitt 3.1 (Abbildung 16) zu finden.

Am ersten Tag ist eine relativ hohe Mortalitätsrate in allen Treatments zu erkennen. Dies liegt daran, dass sich die Larven in den ersten Tagen an die Umgebungsbedingungen gewöhnen müssen, welches eine Herausforderung an das Überleben darstellt. Außerdem muss davon ausgegangen werden, dass nicht alle Larven durch z.B. Schädigung oder ungünstige Bedingungen die Umsetzung bzw. den Transport überlebt haben.

Die Mortalitäten im Zeitraum von Tag 7 bis Tag 24 folgen bei allen Treatments einer Gauß-Verteilung mit einem Peak an 12/13 dph bzw. 15 dph. Die Peaks in der Mortalität lassen sich anhand der Verdauungsphysiologie der Larven erklären (s. Kapitel 1.3): Tag 7 liegt am Ende der dritten Lebensphase der Fischlarven, dem frühen Larvenstadium. In diesem Stadium existiert die exogene und endogene Verdauung nebeneinander. Je weiter eine Larve sich in dieser Lebensphase ausgebildet hat, desto wahrscheinlicher ist es, dass der Dottersack schon aufgebraucht wurde und das Überleben der Fischlarve durch eine ausschließlich exogene Futtermittelaufnahme gesichert werden muss.

## Diskussion

Dabei spielen viele Faktoren eine Rolle, wie erfolgreich ein Individuum bei der effektiven Futteraufnahme ist: Das Aufbrauchen der Energiereserve bei der Futteraufnahme, zufällige Variation der aufgenommenen Nahrungsmenge bei einem Individuum, Verletzungen oder Deformationen oder auch Futterwegfraß durch stärkere Konkurrenz sind einige Beispiele solcher Faktoren.

In dem Übergang von endogener zu exogener Ernährung, sind die Energiereserven der Larven gering und schnell erschöpft, wodurch die Kumulation von wenigen Misserfolgen schon zu einem kritischen Lebensenergieverlust und damit zum eventuellen Tod führen kann.

Wie in Abbildung 16 zu sehen, sammeln sich die Maxima der Mortalitätsrate für alle Treatments im oben genannten Zeitraum. Auffällig ist hier, dass die Peaks der Treatments 2 und 4 zeitlich nach hinten versetzt sind, zu den Mortalitätspeaks der übrigen Treatments. Außerdem haben die Treatments 2 und 4 in ihren Peaks eine geringere Mortalitätsrate. Dies könnte bedeutet, dass die erste Etappe der Fütterungsregime dieser Treatments für die Aufzucht von Larven geeigneter ist: Beide Treatments bestehen zu diesem Zeitpunkt aus MD, Microalgen und der Copepodenart *Acartia tonsa*.

Der Unterschied zwischen Treatment 2 und 4 liegt gegen Ende dieser Phase (ab 18 dph) bei Treatment 2, welches zusätzlich frische Artemien verfüttert bekommt. Hier erkennt man anhand der kumulativen Mortalitätsrate, dass dieses Treatment ab dem Verfütterungszeitpunkt der Artemien einen größeren Abstand zum Treatment 4 gewinnt und die Mortalitäten dort geringer sind.

Daraus lässt sich schließen, dass die Copepoden in Kombination mit den MD den Verlust an Larven verringern können und für die erste Lebensphase geeigneter sind. Dies deckt sich mit dem derzeitigen Kenntnisstand, dass Copepoden den Nährstoffbedarf der Fischlarven am besten deckt (Rasdi & Qin, 2014). Dieser Effekt scheint durch Artemien zusätzlich verstärkt zu werden.

Im weiteren Lebensverlauf, während einer vollständig exogenen Ernährung, helfen die aufgebauten Energiereserven bei der Kompensation der sich auf die Larven negativ auswirkender Ereignisse, welche die Aufnahme von Nahrung beeinflussen („Hungerkapazität“).



## Diskussion

Ein solches negatives Ereignis ist bei dem Treatment 4 des Aufzuchtanks 9 vorgekommen. Der Feeder dieses Tanks ist zwischen 23 dph und 24 dph ausgefallen, wodurch dieser Tank keine Fütterungsevents mit micro diets erhielt. Durch die bereits aufgebauten Energiereserven konnten die meisten Larven dieses Ereignis überleben, jedoch sind die Auswirkungen dieses Vorfalls im Peak an 27 dph sichtbar: Die Individuen, welche durch den Ausfall ihre Energiereserven aufbrauchen mussten oder durch Konkurrenzkämpfe, um noch vorhandenes Futter, geschwächt waren, konnten trotz wieder vorhandenem Futter, nicht überleben.

Positiv aufgefallen ist, dass die Treatments, welche Artemien erhalten haben, im Fütterungszeitraum ab 22 dph geringere Mortalitäten aufwiesen, als die Treatments, die keine Artemien erhalten haben. Die Unterschiede waren an einigen Tagen signifikant.

Weiterhin auffällig ist der am Tag 10 auftretende Peak des Kontrolltreatments. An diesem Tag haben alle Tanks dieses Treatments einen auffällig hohen Wert in der Tagesmortalität. Jedoch gibt es für diesen Peak keine weiteren Auffälligkeiten oder Erklärungen von Seiten der abiotischen Parameter oder technischer Vorfälle.

Ab 44 dph steigen die Mortalitätszahlen des Treatments 2. Dafür gibt es mehrere mögliche Gründe. Zum einen können die Mortalitäten von Nahrungsmangel stammen, durch die hohe anfängliche Überlebensrate. Die Wahrscheinlichkeit dessen ist jedoch gering, da zu diesem Zeitpunkt die Menge der MD der Überlebensrate angepasst wurde. Außerdem sollten die Energiereserven der Larven in dieser Phase genügen, um einige Tage ohne Futter auszukommen und zu überleben.

Ein weiterer möglicher Grund für die steigenden Mortalitätszahlen in Treatment 2 ist Kannibalismus. Für die Mortalitätszahlen wurden neben vollständig erhaltenen Larven, auch Larvenrückstände (z.B. Schwanzflossen oder halbe Larven) als tote Larve gezählt. Dabei wurden Larvenrückstände in allen Treatments gefunden, jedoch wurde nicht dokumentiert, ob ein Treatment eine besonders hohe Tendenz dazu aufwies.

Das Vorhandensein von Larvenrückständen ist ein deutliches Indiz für Kannibalismus und wird zusätzlich unterstützt durch die Größenheterogenität (Abbildung 20) ab dem genannten Zeitpunkt. Für möglichen Kannibalismus, muss die Größe des Jägers in einigen Fällen nur 1,5 – 1,8 mal die Länge der Beutelarve sein (Baras & Jobling, 2002).

## Diskussion

Die Größenheterogenität begünstigt oder ermöglicht Kannibalismus vor allem im Larvenstadium, da Larven im Verhältnis zur Körpergröße ein großes Maul haben und Kannibalismus an Beutetieren ausüben können, die nur geringfügig kleiner sind (Baras & Jobling, 2002).

Ein Auslöser für den steigenden Kannibalismus ab diesem Zeitpunkt kann die wachsende Größenheterogenität in den Aufzuchtanks des Treatment 2 sein, welche nicht nur den Kannibalismus auslösen, sondern auch die Dynamik des Kannibalismus beeinflussen kann (Kestemont et al., 2003). Dies würde erklären, warum im Kontrolltreatment keine stark steigenden Mortalitäten zu erkennen waren, trotz einer deutlichen Größenheterogenität. Die Besetzungsdichte im Kontrolltreatment war, durch das frühe Absterben durch weniger geeignetes Futter, geringer.

Auch wenn Kannibalismus eine sinnvolle mögliche Erklärung für die gegen Ende des Versuches auftretende Erhöhung in der Mortalitätsrate darstellt, so kann auch hier die Kumulation mehrerer Faktoren den tatsächlichen Beitrag geleistet haben.

Es sei angemerkt, dass Kannibalismus auch spontan sowohl in Einzelfällen als auch wiederholt auftreten kann, nur durch das Vorhandensein von hohen Größenheterogenitäten (Baras & Jobling, 2002; Kestemont et al., 2003). Dies bedeutet, dass Kannibalismus auch in den anderen Treatments aufgetreten sein kann, insofern dort eine Größenheterogenität vorhanden war, dies jedoch an dieser Stelle nicht explizit betrachtet wird.

## 4.2 Trypsinaktivität

Um die Auswirkungen verschiedener Fütterungsregime auf die proteolytische Verdauungsenzymkapazität und insbesondere den Effekt der Artemiafütterung bei Fischlarven von *Sparus aurata* zu untersuchen, wird die Trypsinaktivität in den verschiedenen Futtergruppen als Indikator verwendet.

In vorherigen Studien wurde festgestellt, dass das Ausmaß und die Aktivität der Verdauungsenzyme durch das Larvenalter und -größe beeinflusst werden und zunehmen (Nolting et al., 2001; Salem et al., 2021). Deshalb wurde erwartet, dass mit zunehmendem Alter und Länge die Enzymaktivität steigt. Aus diesem Grund wurde die Enzymaktivität pro Tag und pro Länge betrachtet.

## Diskussion

Die Eintragung der Fütterungszeiträume der Artemia und der Rotatorien- und Copepodenfütterung in den Abbildungen dient der Thesenüberprüfung. Dabei wird überprüft, ob eine kurzzeitige Artemienverfütterung („Kiss of Artemia“) während einer Verfütterung von MD eine höhere Trypsinproduktion in den Fischlarven anregt, als die identische MD Verfütterung ohne Artemiazugabe und ob die Verfütterung von Artemien im fortgeschrittenem Larvenalter zu positiven Effekten bei der Überlebens- oder Wachstums führt.

Die Trypsinaktivität nach dem Larvenalter und die Trypsinaktivität nach der Larvenlänge werden getrennt betrachtet.

### **4.2.1 Trypsinaktivität nach dem Larvenalter**

Bei der Betrachtung der Trypsinaktivität nach dem Larvenalter wurde aufgrund von Schwankungen in Treatment 2 eine Analyse der Trypsinaktivitäten pro Tank durchgeführt. Diese ist in Abschnitt 3.3.2 zu finden.

Der Unterschied in der Trypsinaktivität zwischen den Tanks lässt sich zum Teil anhand des Entnahmezeitpunktes der einzelnen Larvenproben erklären. Die Tanks 11, 12 und 16 des Treatments 2 wurden zu ähnlichen Zeiten am Anfang beprobt. Tank 21 gehörte jedoch zu den letzten beprobten Tanks. Dadurch war der Entnahmezeitpunkt der Larven aus Tank 21 zeitlich versetzt.

Mit zunehmendem Alter und dem damit wechselnden Schwierigkeitsgrad bei der Entnahme der Larven, kam es zu einer zusätzlichen zeitlichen Verzögerung bei der Beprobung bei den Aufzuchtanks, wodurch die Gesamtzeit der Beprobung<sup>3</sup> zunahm. Dadurch konnte es an einigen Tagen dazu kommen, dass eine Fütterung während der Beprobung stattfand und die zu dem Zeitpunkt entnommenen Larven eine höhere Trypsinaktivität aufwiesen, als Larven, die vor der Fütterung entnommen worden sind. Auch konnte es durch die zeitliche Verzögerung dazu kommen, dass die gegen Ende beprobten Tanks Larven enthielten, welche wieder „ausnüchtern“. Dadurch zeigten sich Schwankungen an der Trypsinaktivität.

---

<sup>3</sup> Die Fütterungen fanden in gleichmäßigen über den Tag verteilt Abständen statt (s. Abschnitt 2.2.2.). Eine Beprobung fand geplant zwischen zwei Fütterungen statt. Jedoch konnte aufgrund der Länge der Beprobung eine Fütterung währenddessen stattfinden.

## Diskussion

In der Abbildung 30 zeigen sich Auffälligkeiten an 21 dph und 27 dph, an denen trotz eventueller zeitlicher Verzögerung in der Beprobung, die Trypsinaktivität aller Tanks gesunken oder auf dem selben Level des vorherigen Proben-tages blieb.

Die Abnahme der Trypsinaktivität an 21 dph lässt sich mit der Umstellung des Futters erklären. An 21 dph wurde die Verfütterung der Copepoden beendet. Zusätzlich wurde ab 21 dph während der Entwöhnung von GEMMA NEO 0 neben frischen Artemien auch begonnen die größeren angereicherte Artemien zu verfüttern. Diese Umstellung kann zum einen dazu geführt haben, dass nicht die üblichen Mengen an Lebendnahrung gefressen wurde, da die größeren Artemien schwerer zu jagen waren, als Copepoden. Außerdem kann die Entwöhnung des Trockenfutters verhindert haben, dass zusätzliche MD als Trockenfutter aufgenommen wurde, da sich die Larven an das neue Futter erst gewöhnen mussten. Da weniger Nahrung aufgenommen worden ist, wurde auch weniger CCK ausgeschüttet, was zu einer geringeren Trypsinaktivität in allen Tanks geführt hat.

Bei der Betrachtung der Regressionsgeraden für den Zeitraum von 4 – 30 dph ist zu erkennen, dass die Treatments 2 und 4, welche Copepoden erhalten haben (4 – 21 dph), bis 24 dph eine höhere Trypsinaktivität aufweisen, als die Treatments, welche Rotatorien erhielten. Eine vorhergegangene Studie (Rasdi & Qin, 2014) zeigte, dass Copepoden den Nährstoffbedarf von Fischlarven besser decken konnten.

Die höhere Deckung des Nährstoffbedarfes stammt von den hohen Gehalten an den omega-3 Fettsäuren EPA und DHA und freier Aminosäuren (Rasdi & Qin, 2014). Diese Fettsäuren stimulieren die Ausschüttung des sezernierenden Peptidhormon CCK (Koven et al., 2002), welches die Synthese, Sekretion und den Stopp der Sekretion von Trypsinogen steuert und die Verdauung und das Sättigungsgefühl reguliert (Drossou, 2006). CCK wirkt als Simulant für Synthese und Sekretion der Verdauungsenzyme im exokrinen Pankreas. Eine erhöhte Ausschüttung von CCK führt demnach zunächst zu einer erhöhten Ausschüttung von Trypsin (Tillner et al., 2013).

Dies lässt darauf schließen, dass auch in der vorliegenden Arbeit die Copepoden den Nährstoffbedarf der Fischlarven besser decken konnten.

## Diskussion

Ab 18 dph ist zu erkennen, dass die Steigung der Regressionskurve der Trypsinaktivität der Treatments 1 und 2 zunimmt. Dies könnte auf einen Einfluss der Artemien auf die Trypsinaktivität hinweisen, da am selben Tag die Zugabe der Artemien begann.

Eine zunehmende Steigung in der Regressionskurve ist ebenfalls in dem Treatment 3 erkennbar an 21 dph.

Das Treatment 4 zeigt aufgrund der Verfütterung von Copepoden zunächst eine hohe Trypsinaktivität. Jedoch ändert sich bei dem Treatment die Steigung der Regressionskurve bis 30 dph nicht. Dies bedeutet, dass Treatment 4 im Gegensatz zu den anderen Treatments eine gleichbleibende Zunahme an Trypsin über den Verlauf von 30 Tagen zeigt. Eine Erklärung dafür konnte nicht gefunden werden.

Die ab 45 dph deutlich ansteigenden Trypsinaktivitäten in allen Treatments deuten auf ein ab dem Zeitpunkt durchschnittlich höheres ontologisches Entwicklungsstadium bei den Larven aller Treatments hin. Mit dem Wachstum ist auch eine ansteigende Trypsinkapazität zu erwarten.

Die Messung an 50 dph zeigt die höchste durchschnittliche Trypsinaktivität im gesamten Versuchszeitraum bei allen Treatments. Dabei zeigen sich an dieser Stelle zwei gegeneinander wirkende Trends, bei dessen Ausgleich ein Peak entsteht: Da die Verdauungsenzymaktivität mit der Größe des Individuums steigt (Nolting et al., 2001; Salem et al., 2021) und Fischlarven mit zunehmenden Alter in der Länge auseinanderwachsen (Abbildung 20), werden bei der Zuordnung der Trypsinaktivität zum Alter unter Umständen verschieden große Larven verglichen. Dadurch variieren die Trypsinaktivitäten auch innerhalb der Treatments stark.

Durch den Beginn der Entwicklung des Magens während Frühmetamorphose (13,7 – 18,7 mm) ab etwa 40 dph (Koumoundouros et al., 2008; Moyano et al., 1996) kommt ein weiterer Faktor für die Varianz der Trypsinaktivität hinzu.

Mit dem Beginn der funktionellen Magenentwicklung beginnt die Synthese von Pepsin bei Fischlarven (Cahu & Zambonino-Infante, 1995; Ueberschär, 1999). Im Magen kann die Proteinverdauung mit der Denaturierung und hydrolytischen Spaltung durch Pepsin begonnen werden. Dadurch kommen nicht ganze Proteine, sondern Peptide im Darm an, wodurch allgemein eine geringere Trypsinaktivität im Darm notwendig ist.

## Diskussion

Die Vermischung von Trypsinaktivitäten von Larven verschiedener ontogenetischer Entwicklungsstände führt dazu, dass am gleichen Tag Trypsinaktivitäten von Larven betrachtet werden, bei denen die Magenentwicklung noch nicht begonnen hat (steigende Trypsinaktivität), als auch von Larven, wo dies der Fall ist (sinkende Trypsinaktivität).

Mit zunehmender Verschiebung des ontogenetischen Entwicklungsstadiums der Larven in Richtung der Spätmetamorphose (20,4 – 34,4 mm) (Koumoundouros et al., 2008) nimmt die Trypsinaktivität ab. Dies würde den Peak in der Trypsinaktivität erklären, jedoch kann die aus der Literatur zitierte Erklärung hier nicht überprüft werden, da in dieser Arbeit keine Messung der Pepsinaktivität stattfand.

Durch die genannten Aspekte ist die Aussagekraft der Trypsinaktivität beim Bezug zum Alter vor allem bei älteren Larvenstadien geringer.

### **4.2.2 Trypsinaktivität nach der Larvenlänge**

Bei der Betrachtung der Trypsinaktivität zur Längengruppierung zeigen die verschiedenen Treatments variierend stark-schwankende Trypsinaktivitäten. Diese Schwankungen lassen sich darauf zurückführen, dass der Darminhalt und die Menge des aufgenommenen Futters bei den Fischlarven unterschiedlich sein kann und damit auch die Menge an ausgeschüttetem Trypsin unterschiedlich ist. Mit zunehmendem Alter nimmt die Spannweite der Larvenlänge zu. Dies bedeutet, dass in einer Längengruppierung auch Larven mit unterschiedlichem Alter repräsentiert sein können. Dies ist wichtig zu beachten, da dadurch innerhalb einer Längenklasse die Larven teilweise unterschiedliches Futter bekommen haben können. Damit kann die das Futter in Darm während des Entnahmezeitpunktes ebenfalls schwanken.

Die oben genannten Faktoren können den Mittelwert der Trypsinaktivität gleichzeitig beeinflussen, wodurch Schwankungen entstehen. Auch können die starken Schwankungen in den Längengruppen auf die geringen Mengen der Larven in den einzelnen Längenklassen ab 16,0 mm bis 20,0 mm zurückgeführt werden.

## Diskussion

Da entweder keine oder keine repräsentative Menge an Larven in diesen Längengruppen vorhanden waren, wurde die Trypsinaktivität stark durch die gefressenen Menge und den Zeitpunkt der Beprobung beeinflusst. Dies bedeutet, dass die durchschnittliche Trypsinaktivität stark von der Trypsinaktivität der vorhandenen Larven abhängig war. Wenn eine Larve in dieser Gruppe gehungert hatte, war der Durchschnitt stark verzerrt.

Bei der Betrachtung der Trypsinaktivitäten nach den Längenklassen zeigt das Treatment 2 die höchste durchschnittliche Trypsinaktivität vor dem Ende der Frühmetamorphose (18,5 mm), gefolgt vom Kontrolltreatment und Treatment 3. Das Treatment 4 zeigt die geringste durchschnittliche Trypsinaktivität. Die Unterschiede zwischen den Treatments zeigen jedoch einen Trend auf: Die Gruppe der Treatments, welche Artemien erhalten haben, weisen gegen Ende des Versuches eine höhere durchschnittliche Trypsinaktivität auf.

Für eine mögliche Erklärung der höheren Trypsinaktivität von Treatment 2 im Vergleich zum Kontrolltreatment, muss die Ernährung während der ersten 32 Tage betrachtet werden. Die Treatments dieser Gruppe, haben sowohl frische als auch angereicherte Artemien über unterschiedlich langen Zeiträumen erhalten. In dieser Studie wird versucht zu zeigen, dass der Zusatz von Artemien einen positiven Einfluss auf die Trypsinaktivität hat. Demnach müsste das Kontrolltreatment, da es über einen längeren Zeitraum Artemien bekommen hat, eine höhere durchschnittliche Trypsinaktivität aufweisen, als das Treatment 2. Dies ist bei Betrachtung der durchschnittlichen Trypsinaktivität in den Längengruppen zwischen 15,0 bis 19,0 mm nicht der Fall. Es scheint, dass eine längere Verfütterung von Artemien nicht für den Unterschied zwischen den Treatments verantwortlich ist.

Eine andere mögliche Erklärung für den Unterschied der Trypsinaktivität liegt im Erhalt verschiedener Erstfutter: Das Kontrolltreatment erhielt in der ersten Fütterungsphase zunächst nur Rotatorien, das Treatment 2 erhielt von der ersten exogenen Fütterung bereits MD und Copepoden. Bei den Lebendfuttern ist bekannt, dass Copepoden durch die omega-3 Fettsäuren EPA und DHA eine höhere Deckung des Nährstoffbedarfes erreichen und damit eine höhere Ausschüttung von CCK stimulieren, welches zu einer erhöhten Ausschüttung von Trypsinogen führt (Rasdi & Qin, 2014).

## Diskussion

Die Zugabe von MD als zusätzliche Quelle von Nährstoffen, könnte ebenfalls zu einer höheren Deckung des Nährstoffgehalts beigetragen haben. Der positive Effekt der Zugabe von MD ist ebenfalls beim Vergleich des Treatment 1 und 3 vor der Zugabe der Artemien erkennbar. Bis Tag 18 zeigt das Treatment 1 eine geringere Trypsinaktivität im Vergleich zu Treatment 3, welches an Tag 15 signifikant ist. Die Treatments 1 und 3 unterscheiden sich bis Tag 18 im Fütterungsregime nur durch die Zugabe von MD.

Der positive Einfluss der Artemien auf die Trypsinaktivität zeigt sich auch beim Vergleich der Treatments 2 und 4. Die Treatments 2 und 4 unterscheiden sich im Fütterungsregime nur durch den Zusatz von Artemien bei Treatment 2. Aus dem Abschnitt 3.3.2 (insbesondere Abbildung 31 und Abbildung 37) lässt sich schließen, dass der Zusatz von Artemien zu einem signifikanten Unterschied in der Trypsinaktivität ab einer Größe von 16,5 mm bis 18,5 mm geführt hat.

Diese Beobachtungen zeigen, dass als Erstfutter die Verfütterung von Copepoden mit MD geeigneter ist als die Verfütterung von Rotatorien. Die frühere Umstellung auf eine reine Verfütterung von MD kann ab 21 dph erfolgen. Die Zugabe von Artemien zeigte einen positiven Effekt auf die Trypsinaktivität und eine Senkung der Mortalität. Außerdem zeigte die verkürzte Artemienzugabe von neun Tagen („Kiss of Artemia“) keine nachgewiesenen Nachteile gegenüber einer Zugabe von 15 Tagen.

Es kann in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden, dass mit größerer Länge, die Trypsinaktivität grundsätzlich zunimmt (Nolting et al., 2001; Salem et al., 2021).

### **4.3 Wachstumsrate und Trockengewicht**

Bei der Wachstumsrate lassen sich sowohl das Höhen-, als auch das Längenwachstum und das Trockengewicht betrachten.

Beim Höhenwachstum zeigten sich in der Lebendfutterphase keine signifikanten Unterschiede zwischen den Treatments. Erst ab 35 dph wiesen die Treatments, welche Artemien erhalten hatten, eine Tendenz auf, eine größere Höhe zu erreichen. Gegen Ende des Versuchszeitraumes waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.



## Diskussion

Beim Längenwachstum zeigt sich, dass die beiden Treatments 2 und 4 in den Tagen 6 dph und 18 dph am besten gewachsen waren. Dabei zeigt das Treatment 4 die größte Längenzunahme in dieser Zeit. An der Hälfte dieser Tage war die Länge der beiden Treatments signifikant größer zu den Treatments 1 und 3.

Daraus lässt sich schließen, die Verfütterung von Copepoden als Erstlebensfutter geeigneter war, als die Verfütterung von Rotatorien. Diese Beobachtung deckt sich mit den Beobachtungen aus 4.2 und mit der Literatur (Drillet et al., 2011; Rasdi & Qin, 2014).

Ebenfalls deckt sich diese Beobachtung mit der Zunahme des Gewichtes. In den ersten 18 Tagen hatte das Treatment 4 das höchste Gewicht, gefolgt von Treatment 2. Der Unterschied von Treatment 4 zu den anderen Gruppen war erst ab 15 dph signifikant. Ab diesem Zeitpunkt hatte das Treatment 2, welches eine ähnliche Länge zu Treatment 4 hatte, jedoch ein ähnliches Gewicht zu den Rotatorientreatments.

Letzteres lässt sich durch die Betrachtung der Mortalitäten erklären: Die Mortalitäten der Gruppe 4 waren durchgängig größer als die in der Gruppe 2. Zu diesem Zeitpunkt wurde jedoch die Menge an Futter noch nicht der Besatzdichte bzw. der Überlebensrate angepasst, wodurch die Larven des Treatments 2, mit der geringeren Mortalitätsrate, pro Capita weniger Futter bekamen. Vermutlich war das Gewicht in dieser Gruppe deshalb bei gleichem Futter geringer.

Ab 21 dph zeigten die Larven des Treatments 2 das größte Wachstum, während die Larven des Treatment 4 wieder eine ähnliche Länge zu den anderen Gruppen zeigten. Auch zeigte sich eine geringere Gewichtszunahme bei Treatment 4 und eine stärkere Gewichtszunahme bei Treatment 2. Dies kann durch die Umstellung des Futters ab 18 dph erklärt werden. Ab 18 dph wurde die Lebendfütterungsverfütterung für Treatment 4 beendet und diese Gruppe wurde nur noch mit micro diet gefüttert. Das Treatment 2 erhielt statt Copepoden frische Artemianauplien. Treatment 4 erhielt dadurch scheinbar weniger geeignetes Futter, wodurch das Wachstum in die Länge und die Gewichtszunahme eingeschränkt wurde. Das Treatment 2 hingegen konnte den Vorsprung im Trockengewicht und Längenwachstum durch das geeignetere Anfangslebensfutter von Copepodennaulpii (Rasdi & Qin, 2014) durch den Einsatz durch Artemien halten und ausbauen.

## Diskussion

Dies deckt sich mit vorangegangenen Studien, bei denen eine Gewichts- und Größenzunahme bei Fischlarven festgestellt wurde, welche zusätzlich zu MD Artemien erhielten (Kolkovski et al., 1997).

Dies geschah jedoch nur solange die Verfütterung von Artemien in Treatment 2 erfolgt war. Dies lässt sich daran erkennen, dass nach Beendigung der Artemienverfütterung an 26 dph der Unterschied in der durchschnittlichen Länge der Treatmentgruppe 2 zu den restlichen Treatments stetig geringer wird.

Der Wachstumsschub durch Artemien lässt sich auch in der Kontrollgruppe erkennen: Obwohl die Kontrollgruppe in den ersten 15 Tagen schlechter gewachsen war, als die restlichen Gruppen, zeigte sich ab 18 dph ein Längenwachstumsschub, welcher sich auf die Zugabe von Artemien zurückführen lässt. Auch zeigt sich in der Kontrollgruppe ein rapider Anstieg im Trockengewicht nach der Zugabe von Artemien. Der positive Einfluss von Artemien auf das Wachstum wurde auch von Tillner et al. (2013) gefunden werden und deckt sich mit den Beobachtungen zur Wachstums- und Gewichtszunahme aus Kolkovski et al. (1997).

Die ab 30 dph starke Steigung in der Länge der Kontrollgruppe kann mehrere Ursachen haben und spiegelt sich auch im Trockengewicht wieder. Ein Grund kann die Zugabe von micro diet zum üblichen Futter gewesen sein. Jedoch erhielten auch die anderen Gruppen das selbe Trockenfutter und zeigten keine Auffälligkeiten beim Wachstum.

Ein anderer Grund für einen starken Längenzuwachs wäre der Bezug von zusätzlichen Nährstoffen. Eine Möglichkeit diese zu erhalten, wäre durch z.B. Kannibalismus. Die in den kleineren Larven vorhanden omega-3 Fettsäuren und Enzyme können den Nährstoffbedarf der größeren wachsenden Larven besser decken (Rasdi & Qin, 2014), als MD. Durch diesen Zusatz an Nährstoffen, hatte die Kontrollgruppe die Möglichkeit ab diesem Zeitpunkt besser zu wachsen.

Wie in 4.1 angemerkt, kann Kannibalismus sowohl spontan in Einzelfällen als auch Wiederholt nur durch das Vorhandensein von hoher Größenheterogenität auftreten (Baras & Jobling, 2002; Kestemont et al., 2003). Eine Größenheterogenität ist, wie aus Abbildung 20 zu entnehmen, in allen Treatments gegeben, wodurch die Möglichkeit plausibel ist.

## Diskussion

Jedoch müsste sich dieser mögliche Kannibalismus, wie bei Treatment 2 in Abschnitt 4.1., in den Daten der Mortalitätsrate widerspiegeln. Diese deutliche Zunahme wäre in den Mortalitäten erkennbar gewesen. Da dies nicht der Fall ist, ist es nicht plausibel, dass die Wachstumszunahme alleine auf Kannibalismus beruht.

Ein anderer Grund für die Zunahme der Länge und des Trockengewichtes, wäre eine durch die Größenheterogenität ungerechte Futterverteilung. Schon ab 30 dph ist eine sichtbare Größenheterogenität in Abbildung 20 bei dem Treatment 1 zu erkennen. Dies zeigt sich durch die Größe des Interquartilsabstandes. Es ist zu erkennen, dass eine Tendenz zur Aufspaltung der Larvenlängen in zwei Kategorien vorhanden ist. Dadurch gibt es Larven, welche eine gewisse Größe erreicht haben und dadurch den kleineren Larven die Nahrung wegfressen können. Die dadurch gut ernährten Larven, nehmen an Größe zu. Die Larven, welche nur eine geringe Menge an Nährstoffen bekommen können, wachsen langsamer. Die größeren Larven profitieren mit der Zeit mehr, da sie eine größere Menge an Nahrung den kleineren Larven wegfressen können, wodurch sich eine Aufspaltung in zwei Trends entwickelt. Dies sieht man daran, dass der Interquartilsabstand mit zunehmendem Larvenalter größer wurde (Aufspaltung in zwei Größengruppen).

Die gut ernährten und dadurch schneller gewachsenen Larven konnten früher einen höheren ontogenetischen Entwicklungsstand (Frühmetamorphose; 13,7 – 18,7 mm) erreichen. Dadurch war es ihnen früher möglich mit der Ausbildung eines funktionellen Magens zu beginnen und die im Futter vorhandenen Nährstoffe effizienter zu nutzen. Durch die effizientere Nutzung der Nährstoffe, konnten den ausgebildeteren Larven schneller mehr Gewicht und Länge anlegen. Dies ist in Abbildung 20 erkennen.

Der Grund, warum die anderen Treatments diese Tendenz nicht so stark aufzeigen, ist da es bei diesen Gruppen scheinbar nicht zu einer so starken Aufspaltung gekommen ist. Jedoch kann mit dieser Erklärung der positive Langfristige-Effekt einer Artemienzugabe über 15 Tage bei Treatment 1 nicht ausgeschlossen werden.

## **5. Versuchs- und Methodenkritik**

Die Akkumulation verschiedener variabler Faktoren auf ein beobachtetes Ergebnis kann dazu führen, dass aus den Daten eindeutige Schlüsse schwerer zu gewinnen sind und mehrere Interpretationsmöglichkeiten entstehen. Dies bedeutet, dass bei vielen sich verändernden Variablen während eines Versuches die Auswirkungen einer einzelnen Variable nicht eindeutig zu erkennen sind. Die Auswirkungen einzelner Variablen vermischen sich mit den Auswirkungen verschiedener anderer Variablen. Diese können zusammen so auf das Ergebnis wirken, dass eine eindeutige Interpretation erschwert wird.

Mit zunehmendem Alter und der damit verbesserten Schwimffähigkeit, konnten die Larven den Fangversuchen bei der Beprobung besser entkommen. Dadurch verlängerte sich die Dauer der Probennahme pro Tank, wodurch sich die Gesamtzeit der Beprobung erhöhte. Bei gleichbleibender Reihenfolge der Aufzuchtanks verschob sich der Zeitpunkt der Entnahme stärker bei Tanks am Ende der Beprobung. Dadurch konnte trotz gleichzeitiger Fütterung bei einigen Larven schon eine Verdauung stattfinden, wohingegen bei anderen der Darm das noch unverdaute Futter enthielt. Dadurch konnte nicht die tatsächliche Basisenzymaktivität gemessen werden, wodurch der Darmfüllungsgrad als Co-Variable zu den individuellen Aktivitätsschwankungen hätte berücksichtigt werden müssen.

Die Akkumulation dieser variablen Faktoren konnte dazu führen, dass die Trypsinaktivität der Gruppen verzerrt dargestellt wurde. Diese Verzerrungen erschweren die Interpretation der Ergebnisse und die daraus resultierenden Schlussfolgerungen. Eine weitere Verzerrung der Trypsinaktivität entstand durch Fütterungen, welche durch zeitliche Verschiebung der Beprobung während der Probennahme stattfanden.

Beide Kritikpunkte könnten durch die Verschiebung des Beprobungszeitpunktes und Erhöhung der an der Beprobung beteiligten Personen behoben werden. So würde eine Beprobung vor der ersten Fütterung mit mehreren Personen die Gesamtzeit und die mögliche zunehmende Zeit der Beprobung verringern und die individuellen Schwankungen bei der Messung der Basisenzymaktivität durch den Darmfüllungsgrad begrenzen.

## Versuchs- und Methodenkritik

Jedoch würde eine Zunahme an Personen potentiell zu anderen Verzerrungen führen. Unbewusste menschliche Präferenzen können bei der Probennahme zu künstlich eingebrachten Tendenzen führen. Beispielsweise könnten die Daten auf die Tendenz einer größeren Längenzunahme eines Tankes hinweisen, wo die anderen Tanks des selben Treatments größere Streuungen aufweisen. Aus den Daten ist nicht zu entnehmen, ob es sich dabei um einen menschlichen Faktor oder um eine faktische Tendenz handelt.

Ein weiterer Fehlerfaktor ist die Messgenauigkeit bei der Aufnahme der Wachstumsparameter. Die Messgenauigkeit von  $\pm 0,5$  mm bei einer etwaigen Endlänge der Larve von 20 mm ergibt eine Messungenauigkeit von 2,5 %. Diese Messungenauigkeit führte neben den oben genannten Verzerrungen zu einer höheren Streuung in den Daten. Mit einer höheren Messgenauigkeit könnte die Streuung reduziert werden und die Tendenzen klarer aufgezeigt.

Desweiteren wäre für diese Arbeit eine Analyse der Pepsinaktivität von Vorteil gewesen, um einen definitiven Zeitpunkt für die Entwicklung eines funktionellen Magens bestimmen zu können. Somit hätte die aus der Literatur gebildete Erklärung der Peaks in der Trypsinaktivität überprüft und belegt werden können.

## **6. Schlussfolgerung und Aussicht**

In dieser Studie zeigte sich, dass die Zugabe von Artemien sich positiv auf die Trypsinaktivität von Goldbrassenlarven (*Sparus aurata*) ausgewirkt hat. Dabei ließen sich bei der verkürzten Artemienzugabe von neun Tagen („Kiss of Artemia“) keine erkennbaren Nachteile für die Trypsinaktivität gegenüber der Artemienzugabe über 15 Tage aufzeigen.

Außerdem konnte Kombination von Copepoden und MD als Erstfutter die Anfangsmortalität erheblich senken. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von Artemien gesteigert werden, sodass ein signifikanter Unterschied in der Mortalitätsrate von Treatment 2 gegenüber den Treatments 1 und 3 erkennbar war. Es wurde im Allgemeinen beobachtet, dass die Artemienzugabe die Mortalitätsrate senkte.

Während der Zugabe von Artemien wurde ein positiver Effekt auf das Wachstum und die Gewichtszunahme festgestellt, welcher im Fall der verkürzten Zugabe nur bis zur Beendigung dieser anhielt. Im Fall der Zugabe von Artemien über 15 Tage konnte ein positiver Langzeit-Effekt nicht ausgeschlossen, jedoch auch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Für den Ausschluss oder Nachweis eines Langzeiteffektes bei der Zugabe von Artemien über 15 Tage müsste eine weitere Aquakultur-Studie erfolgen, welche den direkten Vergleich der Artemienzugabelänge betrachtet. Zur Ausschließung der Erstfüttereffekte, müssten mindestens zwei Gruppen von verschiedenen Erstfuttern gebildet werden, welche jeweils beide Zugabezeiträume betrachten (vier Treatments).

In Betracht der bedeutenden Aspekte zur Eignung der Fütterungsregime für die Aufzucht von Goldbrassenlarven zeigt die Co-Fütterung von Copepoden mit micro diet als Erstfütterung und einer kurzen Artemienzugabe (Treatment 2) das beste Gesamtergebnis.

## 7. Literaturverzeichnis

algova. (2017). *Die Größe von Artemia Nauplien und Artemia Eiern*.

<https://blog.algova.com/2017/09/21/artemia-groesse/>

Baras, E., & Jobling, M. (2002). Dynamics of intracohort cannibalism in cultured fish.

*Aquaculture Research*, 33, 461–479. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00732.x>

Cahu, C. L., & Zambonino-Infante, J.-L. (1995). Maturation of the pancreatic and

intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol Biochem*, 14, 431–437.

<https://doi.org/10.1007/BF00004343>

Carter, C. G. (2015). Feed and Feeding Practices in Aquakulture || Feeding in

hatcheries 2015. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, 317–348. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100506-4.00013-1>

Chen, G., & Hare, M. P. (2008). Cryptic ecological diversification of a planktonic

estuarine copepod, *Acartia tonsa*. *Molecular Ecology*, 17(6), 1451–1468.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03657.x>

Compassion in Food Business. (2021). *Gilthead seabream (*Sparus aurata*) statistics summary*.

<https://www.compassioninfoodbusiness.com/media/7447728/gilthead-seabream-in-numbers.pdf>

*Dorade (Goldbrasse)*. (2019, Mai). Aquakulturinfo.

<https://www.aquakulturinfo.de/dorade-goldbrasse>

Drillet, G., Frouël, S., Sichlau, M. H., Jepsen, P. M., & Højgaard, J. K. (2011). Status

and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed.

## Literaturverzeichnis

*Elsevier Aquakulture*, 315, 155–166.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.027>

Drossou, A. (2006). *CCK concentration and tryptic activity in early stages of finfish larvae* [Aus dem Leibniz-Institut für Meereswissenschaften an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel]. <https://d-nb.info/980888069/34>

Elbal, M. T., García Hernaéndez, M. P., Loranzo, M. T., & Agulleiro, B. (2004). Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquakulture*, 234, 215–238. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.028>

*Fischlexikon: Goldbrasse, Dorade (Sparus aurata)*. (o. J.). Fischlexikon. Abgerufen 8. Dezember 2022, von [https://www.fischlexikon.eu/fischlexikon/fische-suchen.php?fisch\\_id=0000000140](https://www.fischlexikon.eu/fischlexikon/fische-suchen.php?fisch_id=0000000140)

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). *The state of World Fisheries and Aquakulture* (S. 224). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf>

Food and Agriculture Organization of the United Nations, S. T.-F. and A. D. (2016). *FishStat plus. Capture and aquaculture production 1950-2014*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, S. T.-F. and A. D. (2019). *AO Yearbook of Fishery and Aquaculture Statistics*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [https://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2019\\_USBcard/navigation/index\\_intro\\_e.htm](https://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2019_USBcard/navigation/index_intro_e.htm)

Georgakopoulou, E., Katharios, P., Divanach, P., & Koumoundouros, G. (2010). Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead



## Literaturverzeichnis

- seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquakulture*, 308, 13–19.  
<https://doi.org/doi:10.1016/j.aquaculture.2010.08.006>
- Giebichenstein, J., Giebichenstein, J., Hasler, M., Schulz, C., & Ueberschär, B. (2021). Comparing the performance of four commercial microdiets in an early weaning protocol for European seabass larvae (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Research*, 53(2), 544–558. <https://doi.org/10.1111/are.15598>
- Gonzales, G. (2013). *Acartia tonsa* (On-line). Animal Diversity Web, University of Michigan-Ann Arbor. [https://animaldiversity.org/accounts/Acartia\\_tonsa/](https://animaldiversity.org/accounts/Acartia_tonsa/)
- Gonzales, R. (2022, Januar 21). *Artemia vs. Microdiets in early weaning in European sea bass larvae*. Hatchery International.  
<https://www.hatcheryinternational.com/artemia-vs-microdiets-in-early-weaning-in-european-sea-bass-larvae/>
- Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L. E. C., & Izquierdo, M. (2013). Fish larval nutrition and feed formulation: Knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Aquaculture*, 5(1), 26–58.  
<https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01086.x>
- Hjelmeland, K. (1995). *Trypsin in fish: Studies of the enzyme and its inhibitors in the digestive system and epidermis of fish*.
- Hjelmeland, K., Huse, I., Jørgensen, T., Molvik, G., & Raa, J. (1984). Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Havforskningsinstituttet*. <http://hdl.handle.net/11250/115106>
- Islam, S., Kibria, M., & Bhuyan, S. (2019). Production of Artemia Biomass in Indoor Culture Tank in Bangladesh. *Journal of Scientific Research*, 11, 101–110.  
<https://doi.org/10.3329/jsr.v11i1.36467>

## Literaturverzeichnis

- Kestemont, P., Jourdan, S., Houbart, M., Mélard, C., Paspatis, M., Fontaine, P., Cuvier, A., Kentouri, M., & Baras, E. (2003). Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: Biotic and abiotic influences. *Aquakulture*, 227, 333–356. [https://doi.org/Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences](https://doi.org/Size%20heterogeneity,%20cannibalism%20and%20competition%20in%20cultured%20predatory%20fish%20larvae:%20biotic%20and%20abiotic%20influences)
- Kolkovski, S. (2013). Microdiets as alternatives to live feeds for fish larvae in aquaculture: Improving the efficiency of feed particle utilization. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, 203–222. <https://doi.org/10.1533/9780857097460.1.203>
- Kolkovski, S., Lazo, J., Leclercq, D., & Izquierdo, M. S. (2009). 11—Fish larvae nutrition and diet: New developments. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, 315–369. <https://doi.org/doi.org/10.1533/9781845696474.3.315>
- Kolkovski, S., Tandler, A., & Izquierdo, M. S. (1997). Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 148(4), 313–322. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01366-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01366-X)
- Koumoundouros, G., Ashton, C., Xenikoudakis, G., Giopanou, I., Georgakopoulou, E., & Stickland, N. (2008). Ontogenetic differentiation of swimming performance in Gilthead seabream (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) during metamorphosis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 370, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.12.001>
- Koven, W., Rojas-García, C. R., Finn, R., Tandler, A., & Rønnestad, I. (2002). Stimulatory effect of ingested protein and/or free amino acids on the secretion of the gastro-endocrine hormone cholecystokinin and on tryptic activity, in

## Literaturverzeichnis

- early-feeding herring larvae, *Clupea harengus*. *Marine Biology*, 140, 1241–1247. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0790-0>
- Leal, M. C., Rocha, R., Rosa, R., & Calado, R. (2016). *Aquaculture of marine non-food organisms: What, why and how?* [Reviews in Aquaculture]. 10.1111/raq.12168
- Leandro, S. M., Tiselius, P., & Queiroga, H. (2006). Growth and development of nauplii and copepodites of the estuarine copepod *Acartia tonsa* from southern Europe (Ria de Aveiro, Portugal) under saturating food conditions. *Marine Biology*, 150, 121–129. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0336-y>
- Liddle, R. A. (2006). Regulation of Pancreatic Secretion. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (4. Aufl., Bd. 2, S. 1397–1435). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012088394-3/50058-1>
- Litvinenko, L. I., Litvinenko, A. I., Boiko, E. G., & Kutsanov, K. V. (2015). Artemia cyst production in Russia. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 33(6). <https://doi.org/10.1007/s00343-015-4381-6>
- Martini, F. (2002, Dezember 15). *The Breeder's Net: Artemia Nauplii As A Food Source*. <https://reefs.com/magazine/the-breeder-s-net-artemia-nauplii-as-a-food-source/>
- Meerwasser-Lexikon Team. (2012). *Brachionus plicatilis*. [https://www.meerwasserlexikon.de/tiere/4318\\_Brachionus\\_plicatilis.htm](https://www.meerwasserlexikon.de/tiere/4318_Brachionus_plicatilis.htm)
- Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcón, F. J., & Sarasquete, M. C. (1996). Characterisation of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Kugler Publications, Fish Physiology and Biochemistry*(15 (2)), 121–130. <https://doi.org/10.1007/BF01875591>

## Literaturverzeichnis

- Murashita, K., Fukada, H., Rønnestad, I., Kurokawa, T., & Masumoto, T. (2008). Nutrient control of release of pancreatic enzymes in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): Involvement of CCK and PY in the regulatory loop. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 150(4), 438–443.
- Nolting, M., Ueberschär, B., & Rosenthal, H. (2001). Trypsin activity and physiological aspects in larval rearing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using live prey and compound diets. *Journal of Applied Ichthyology*, 15(3), 138–142. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.1999.00138.x>
- ProLarva*. (2015, Januar). ProLarva. <http://www.prolarva.org/startseite.htm>
- Rasdi, N. W., & Qin, J. G. (2014). Improvement of copepod nutritional quality as live food for aquaculture: A review. *Aquaculture Research*. <https://doi.org/doi:10.1111>
- Rathore, S. S., Yusufzai, S. I., Katira, N. N., & Jaiswal, K. (2016). Fish Larval Nutrition: A Review on New Developments. *The International Journal Of Engineering And Science (IJES)*, 5(9), 40–47. <https://www.theijes.com/papers/v5-i9/F0509040047.pdf>
- Rojas-García, C. R., & Rønnestad, I. (2002). Cholecystokinin and tryptic activity in the gut and body of developing Atlantic halibut larvae: Evidence for participation in the regulation of protein digestion. *Journal of Fish Biology*, 61, 973–986. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2002.211>
- Rønnestad, I., Yúfera, M., Ueberschär, B., Ribeiro, L., Sæle, Ø., & Boglione, C. (2013). Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: Current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Aquaculture*, 5(1), 59–98. <https://doi.org/10.1111/raq.12010>

## Literaturverzeichnis

- Salem, A. M., Castanho, S., Couto, A., Candeias-Mendes, A., Silva, A., Gamboa, M., Pousão-Ferreira, P., & Ribeiro, L. (2021). How does weaning anticipation affect gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae digestive capacity, growth and survival? *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, 25(5), 865–879. <https://doi.org/10.21608/EJABF.2021.207172>
- Sieg, A., Clemmensen, C., & Ueberschär, B. (1989). Comparison of biochemical and histological methods for the evaluation of the in situ nutritional condition of marine fish larvae. *ICES*. <https://oceanrep.geomar.de/id/eprint/12168>
- Skiftesvik, A. B., Browman, H. I., & St-Pierre, J.-F. (2003). Life in green water: The effect of microalgae on the behaviour of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Department of Fisheries and Oceans Canad; Institute of Marine Research-Austevoll, The Big Fish Bang*, 97–103. <https://fishlarvae.org/life-in-green-water-the-effect-of-microalgae-on-the-behaviour-of-atlantic-cod-gadus-morhua-larvae/>
- Sparus aurata*. (2022, Mai 12). Meerwasser-Lexikon. [https://www.meerwasserlexikon.de/tiere/4542\\_Sparus\\_aurata.htm](https://www.meerwasserlexikon.de/tiere/4542_Sparus_aurata.htm)
- Støttrup, J. G. (2006). A Review on the Status and Progress in Rearing Copepods for Marine Larviculture. Advantages and Disadvantages. Among Calanoid, Harpacticoid and Cyclopoid Copepods. *Danish Institute for Fisheries Research, Department of Marine Ecology and Aquaculture*. [https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion\\_acuicola/VIII/archivos/5Stottrup.pdf](https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/VIII/archivos/5Stottrup.pdf)
- Tamhart, Ayacop, Hügler, & et al. (2022, Juli 18). *Trypsin*. <https://www.chemie.de/lexikon/Trypsin.html>

## Literaturverzeichnis

- Taxacher, M. (2011). *Brachionus plicatilis* ein Rädertierchen für die Massenkultur.  
<https://www.ifmn.net/zuchtberichte/zooplankton/brachionus/brachionus-plicatilis-ein-raedertierchen-fuer-die-massenkultur.html>
- Tillner, R., Rønnestad, I., Dhert, P., & Ueberschär, B. (2013). The regulatory loop between gut cholecystinin and tryptic enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae is influenced by different feeding regimes and trigger substances. *Aquakulture*, 420–421, 139–146.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.046>
- Tillner, R., Rønnestad, I., Harboe, T., & Ueberschär, B. (2013). Evidence for a regulatory loop between cholecystinin (CCK) and tryptic enzyme activity in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, 166(3). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.08.001>
- Überfischung: Bald drohen uns leere Meere. (2022). WWF.  
<https://www.wwf.de/themen-projekte/meere-kuersten/fischerei/ueberfischung>
- Ueberschär, B. (1993). *Measurement of proteolytic enzyme activity Significance and application in larval fish research*. 8. <https://doi.org/284235961>
- Ueberschär, B. (1999). *Die Trypsinaktivität als biochemische Indikator zur Bestimmung des Ernährungszustandes sowie der Freßaktivität von Fischlarven und seine Anwendung in Feldstudien* [Institut für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft].  
<https://www.researchgate.net/publication/301326975>
- Zambonino-Infante, J.-L., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutiérrez, J., & Cahu, C. (2008). Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. *Feeding and Digestive Functions of Fishes* (Oxford & IBH

Literaturverzeichnis

*Publishing Co. Pvt. Ltd*), 281–348.

<https://archimer.ifremer.fr/doc/00086/19684/>





## 8. Anhang

### 8.1 Darstellungen zur Veranschaulichung des Außenbeckens



Abbildung 38 Fotografische Darstellung des Außenbeckens. Foto: Dr. Bernd Ueberschär, BioServe

8.2 Mengen der MD pro Treatment

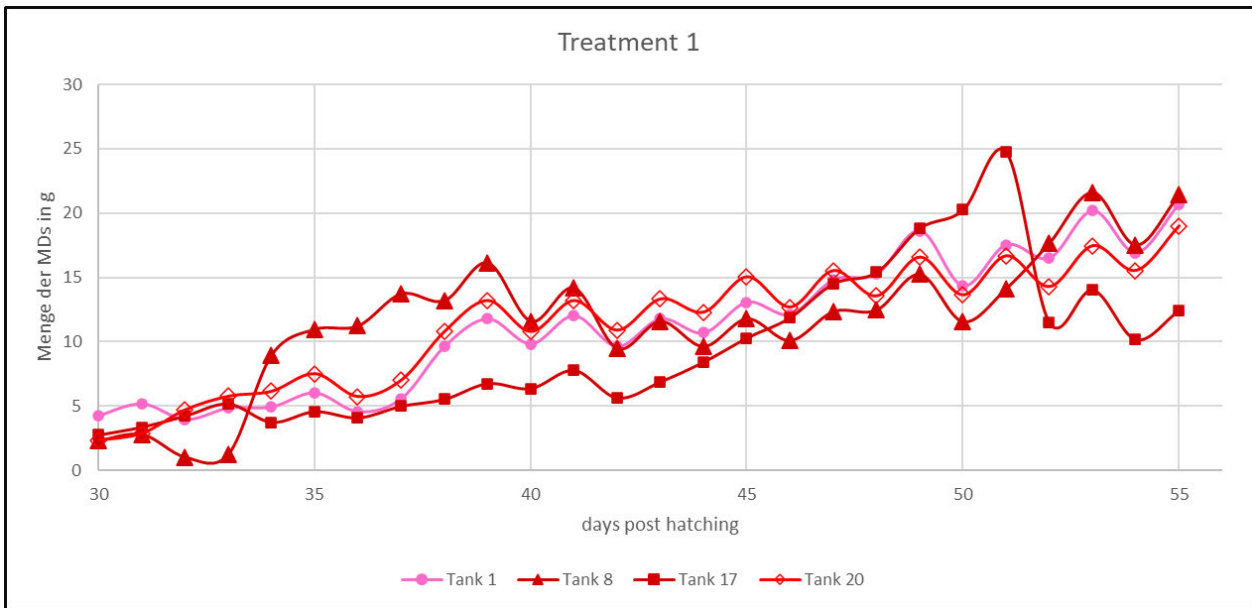


Abbildung 39 Menge der verfütterten MD in Gramm über den Versuchszeitraum für das Treatment 1 in den Tanks 1, 8, 17 und 20.

Aufgrund des späten Weaning wird in diesem Treatment erst ab Tag 30 mit MD gefüttert. Die auftretenden starken Schwankungen stammen wahrscheinlich von den Anpassungen der Feeder.

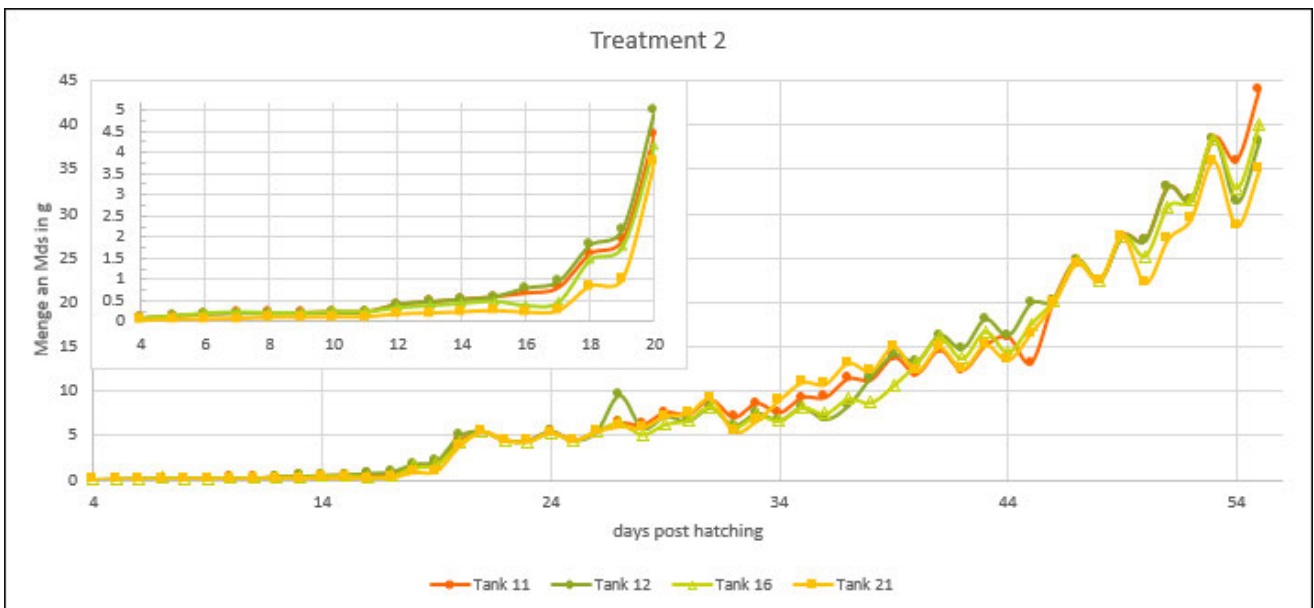


Abbildung 40 Menge der verfütterten MD in Gramm über den gesamten Versuchszeitraum für Treatment 2 in den Tanks 11, 12, 16 und 21.

Die Schwankungen der verfütterten Menge sind gering. In der klein Eingblendeten Graphik sind die Fütterungstage 4 dph bis 20 dph vergrößert dargestellt. Die Legende bezieht sich auf beide Diagrammteile.

## Anhang

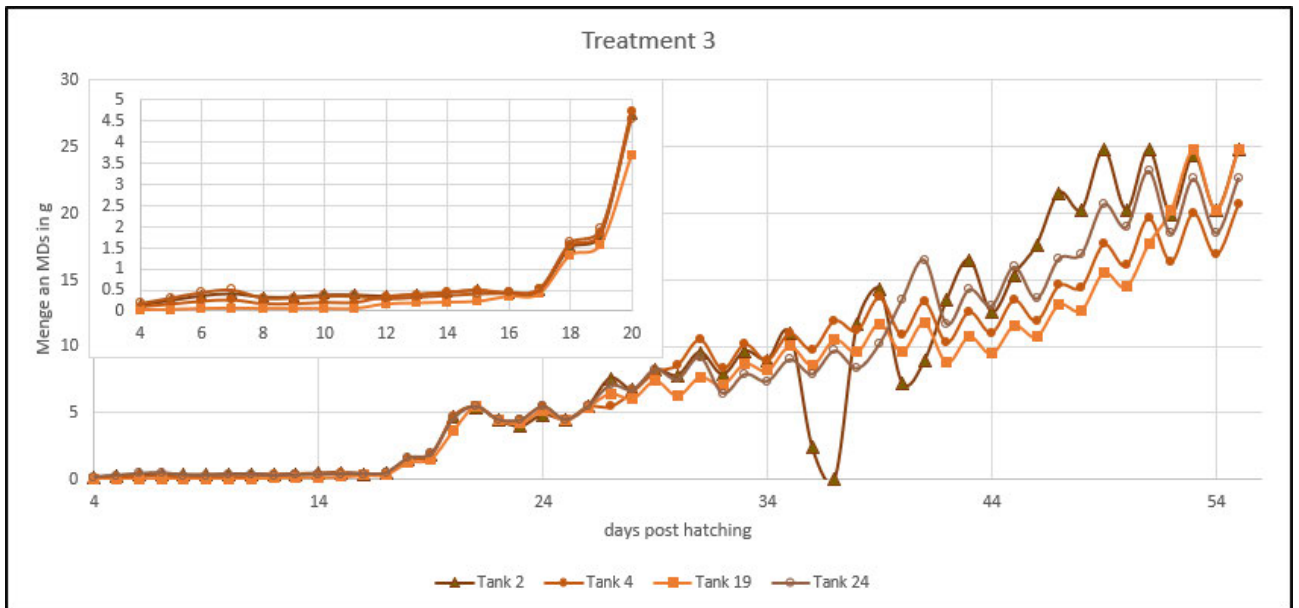


Abbildung 41 Menge der verfütterten MD in Gramm über den gesamten Versuchszeitraum für Treatment 3 in den Tanks 2, 4, 19 und 24.

Die Schwankungen der verfütterten Menge sind gering. In der klein Eingebledeten Graphik sind die Fütterungstage 4 dph bis 20 dph vergrößert dargestellt. Die Legende bezieht sich auf beide Diagrammteile. Fehlende Mengen (Ausreißer) wie in Tank 2 Tag 36 und 37 stammen von Problemen mit den Feeders durch z.B. Impulskontaktverluste oder -ausfälle.

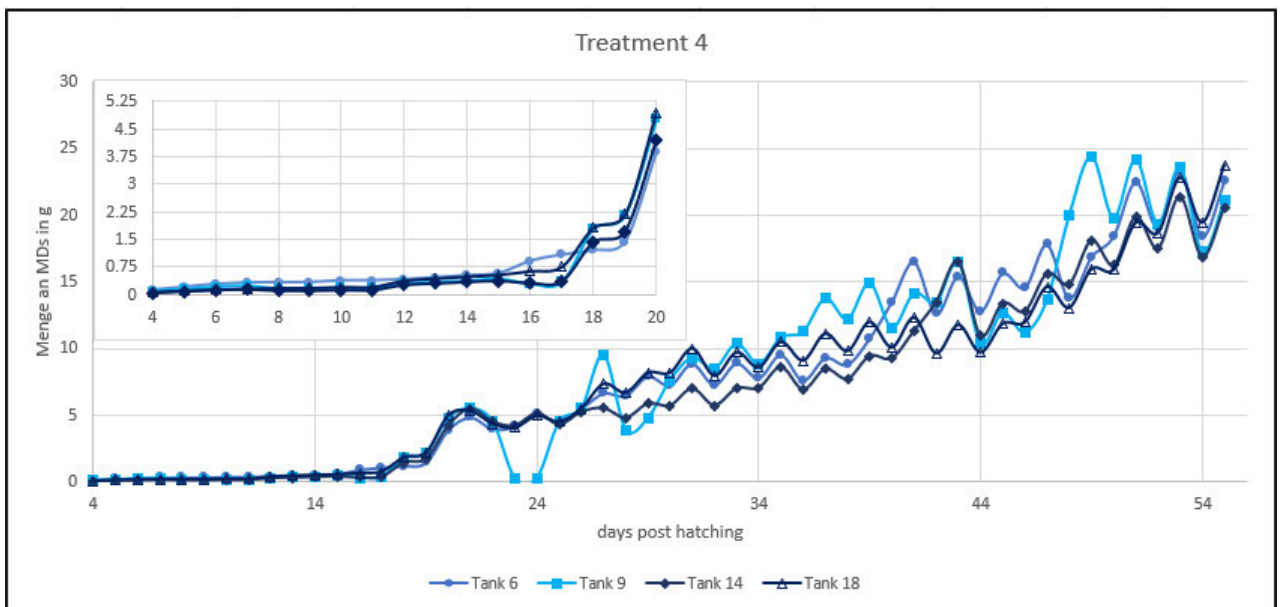


Abbildung 42 Menge der verfütterten MD in Gramm über den gesamten Versuchszeitraum für Treatment 4 in den Tanks 6, 9, 14 und 18.

Die Schwankungen der verfütterten Menge sind gering. In der klein Eingebledeten Graphik sind die Fütterungstage 4 dph bis 20 dph vergrößert dargestellt. Die Legende bezieht sich auf beide Diagrammteile. Die an Tag 23 und 24 in Tank 9 ausgefallene Menge hängt mit einem Ausfall des Feeders zusammen. Dieser Ausfall verursachte die in 3.1 erhöhte Mortalitätsrate.

### 8.3 Mortalitätsraten pro Treatments

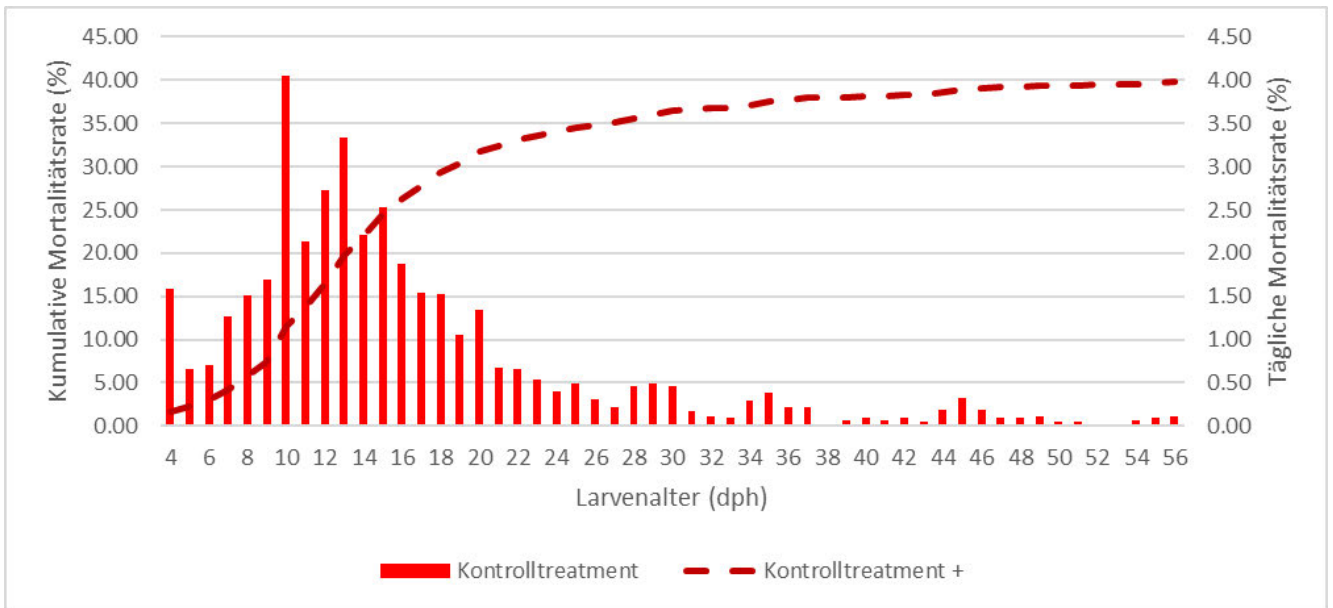


Abbildung 43 Darstellung der kumulativen Mortalitätsrate in Prozent und der gemittelten täglichen Mortalitätsrate in Prozent des Kontrolltreatments während des Versuchszeitraumes.

Es wird von 4500 Larven pro Tank bzw. 18000 Larven pro Treatment ausgegangen.

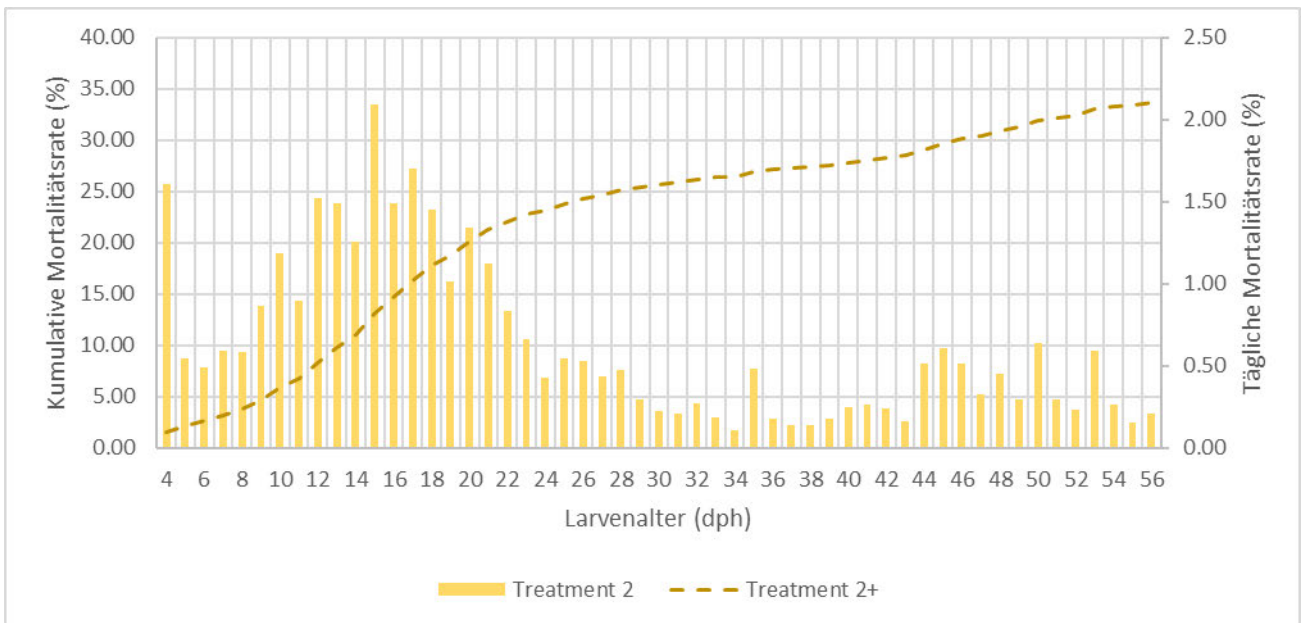


Abbildung 44 Darstellung der kumulativen Mortalitätsrate in Prozent und der gemittelten täglichen Mortalitätsrate in Prozent des Treatments 2 während des Versuchszeitraumes.

Es wird von 4500 Larven pro Tank bzw. 18000 Larven pro Treatment ausgegangen.



## Anhang

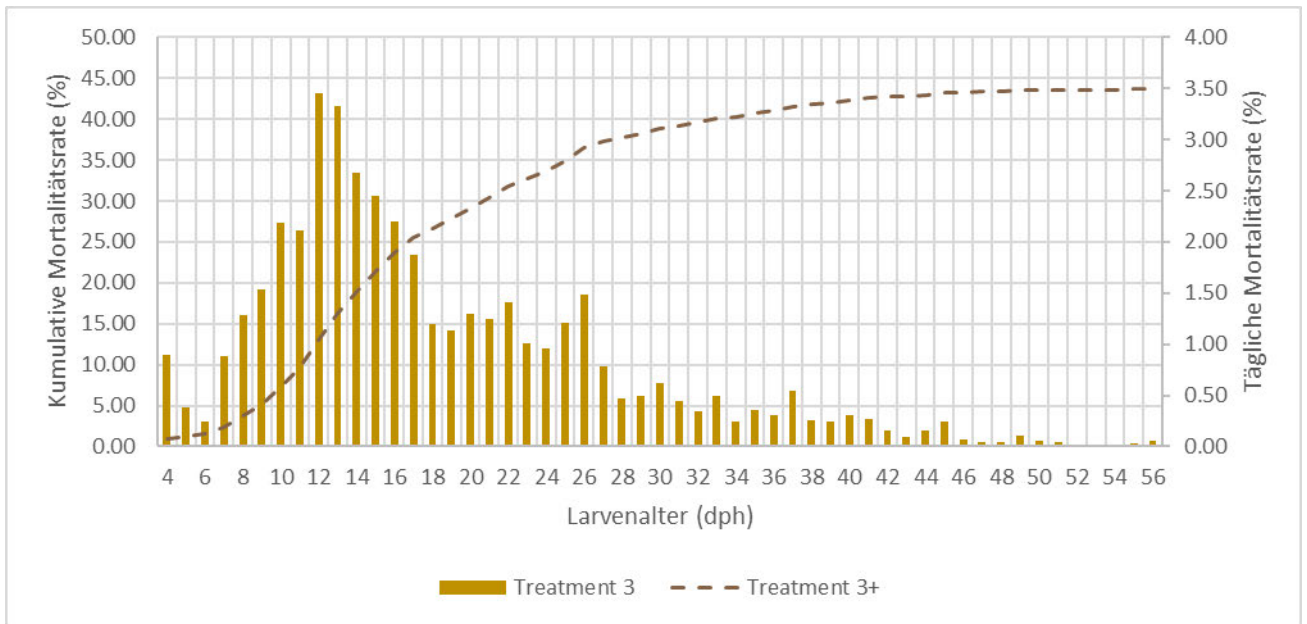


Abbildung 45 Darstellung der kumulativen Mortalitätsrate in Prozent und der gemittelten täglichen Mortalitätsrate in Prozent des Treatments 3 während des Versuchszeitraumes.

Es wird von 4500 Larven pro Tank bzw. 18000 Larven pro Treatment ausgegangen.

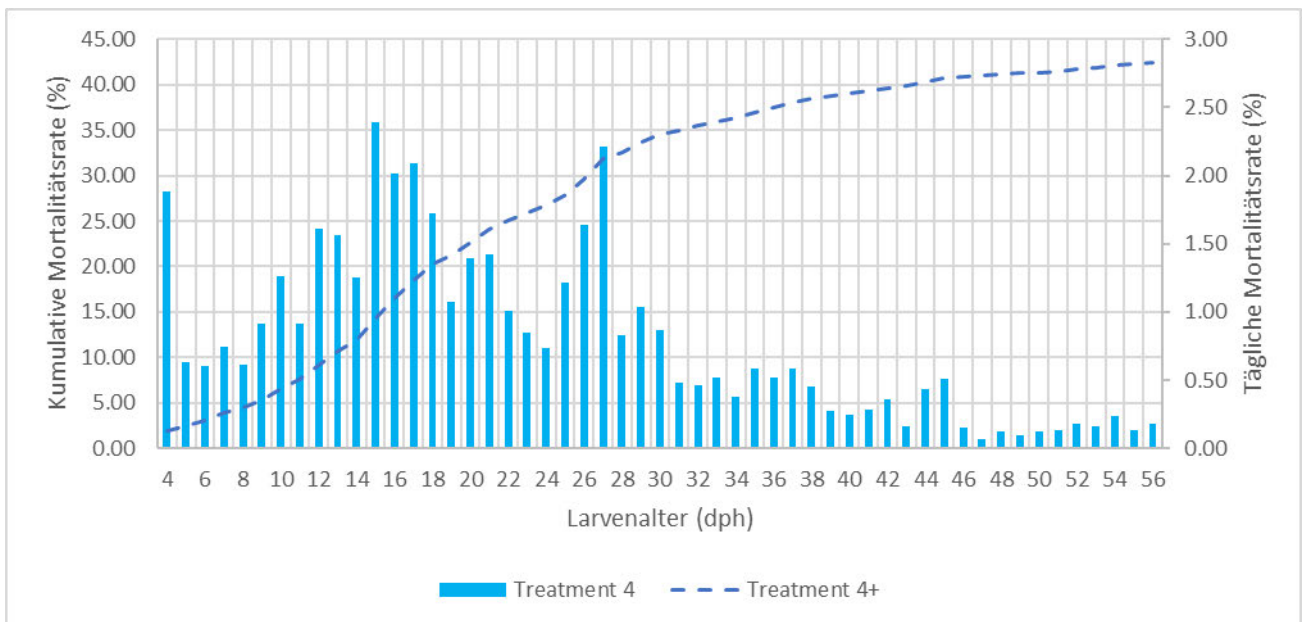


Abbildung 46 Darstellung der kumulativen Mortalitätsrate in Prozent und der gemittelten täglichen Mortalitätsrate in Prozent des Treatments 4 während des Versuchszeitraumes.

Es wird von 4500 Larven pro Tank bzw. 18000 Larven pro Treatment ausgegangen.

## Anhang

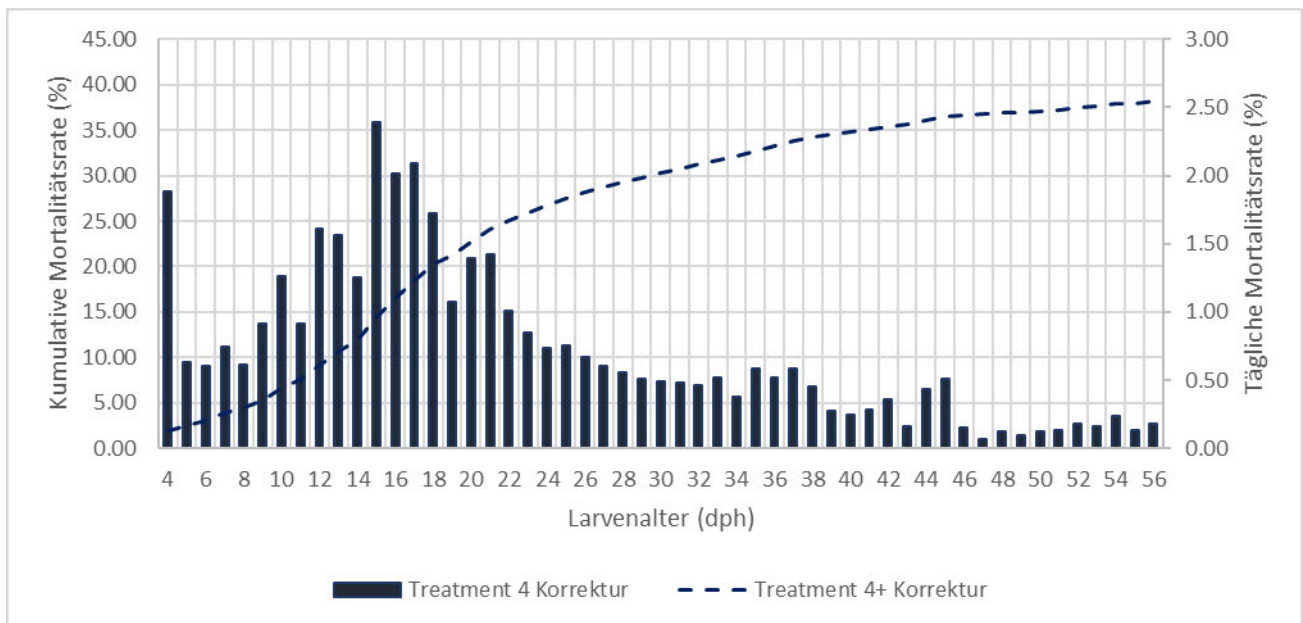


Abbildung 47 Darstellung der kumulativen Mortalitätsrate in Prozent und der gemittelten täglichen Mortalitätsrate in Prozent des Treatments 4 während des Versuchszeitraumes.

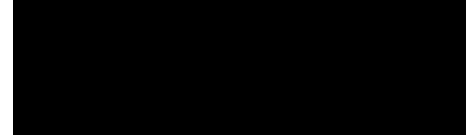
Bei dieser Darstellung wurde der technische Fehler in Tank 9 des Treatments berücksichtigt und eine Annahme der Werte basierend auf den restlichen Tanks des Treatments getroffen. Es wird von 4500 Larven pro Tank bzw. 18000 Larven pro Treatment ausgegangen.

Eidesstattliche Erklärung

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Hamburg, den 20.12.2022



—  
Diana Mikhaylovskaya