

Endbericht des Projekts

**‘Entwicklung eines Konzeptes zur schadstofffreien Hygienisierung in geschlossenen
Aquakulturkreislaufanlagen unter besondere Berücksichtigung der Fischgesundheit’**

AZ 30973-34

Projektleitung:

Dr. Thomas Meinelt¹, Prof. Dr. Werner Kloas¹, Dr. Klaus Knopf¹

Projektbearbeitung:

Dibo Liu^{1,2}

Kooperationspartner:

Lars-Flemming Pedersen³, David L. Straus⁴

¹Abteilung Ökophysiologie und Aquakultur, Leibniz-Institut für Gewässerökologie und
Binnenfischerei, Müggelseedamm 310, 12587 Berlin

²Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften,
Lebenswissenschaftliche Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin, Invalidenstr. 42, 10115
Berlin

³DTU-Aqua, National Institute of Aquatic Sciences, Section for Aquaculture, North Sea
Research Centre, P.O. Box 101, DK-9850 Hirtshals, Denmark

⁴U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Harry K. Dupree—Stuttgart
National Aquaculture Research Center, P.O. Box 1050, Stuttgart, AR 72160, USA

Berlin, Jul. 2016

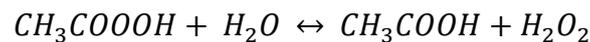
Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Chemische Charakteristik der Peressigsäure	1
1.2.	Peressigsäure in der Aquakultur	2
1.3.	Vergleich der Peressigsäure mit anderen in RAS genutzten Desinfektionsmitteln	3
1.4.	Toxizität von Peressigsäure gegen Fische	4
1.5.	Ziele der vorliegenden Studie	4
2.	Materialien und Methoden	5
2.1.	Chemikalien	5
2.2.	Experimentelles Design	5
2.2.1.	Test 1: Effekt von Peressigsäure auf Karpfen in Massenproduktion-RAS	5
2.2.2.	Test 2: Effekt von Peressigsäure auf Karpfen in Pilot-RAS	6
2.2.3.	Test 3: Effekt von Peressigsäure auf Regenbogenforellen in Durchflusssystemen	7
2.3.	Bestimmung der PES- und Wasserstoffperoxidkonzentration	8
2.4.	Stressmonitoring der Fische	9
2.5.	Messung der angeborenen zellulären Immunität	10
2.6.	Histologische Analyse der Kiemen	11
2.7.	Statistics	12
3.	Ergebnisse	12
3.1.	Test 1	12
3.1.1.	Fundamentale physiologische Parameter	12
3.1.2.	Kiemenhistologie	13
3.1.4.	Angeborene zelluläre Immunität	16
3.2.	Test 2	17
3.3.	Test 3	21
3.3.1.	Wassercortisol	21
3.3.2.	Wachstum	23
3.3.3.	Angeborene zelluläre Immunität	24
3.3.4.	Wasserwerte	25
4.	Diskussion	30
4.1.	Adaptation der Fische an Peressigsäure-induzierten Stress	30
4.2.	Einfluss der Sozialstruktur auf Wassercortisol	32
4.3.	Peressigsäure hat keinen Einfluss auf Wachstum und angeborene zelluläre Immunität	33
4.4.	Einfluss von Peressigsäure auf die mikrobielle Aktivität des Wassers	33
4.5.	Peressigsäure fördert die Gesundheit der Fischkiemen in RAS	35
4.6.	Anwendungsstrategie von Peressigsäure in RAS	36
5.	Zusammenfassung und Perspektive	37
6.	Danksagungen	38
7.	Literatur	39

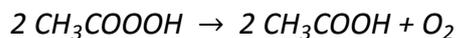
1. Einleitung

1.1. Chemische Charakteristik der Peressigsäure

Die Peressigsäure (PES) ist ein stark oxidativer Stoff. Die chemische Formel ist $\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$. Da reine PES hoch korrosiv und entflammbar ist, wird sie normalerweise in wässrigen Lösungen verwendet. In wässriger Lösung unterliegt sie folgendem Gleichgewicht (Wagner et al., 2002):



Die Reaktion mit Namen Hydrolyse ist reversibel. Die PES-Lösung ist somit ein Gleichgewicht zwischen PES und Wasser auf der einen Seite sowie Essigsäure und Wasserstoffperoxid auf der anderen. Kommerzielle PES-Lösungen beinhalten zusätzlich Stabilisatoren zur Sicherung des Gleichgewichts aller Komponenten. Bekannte Stabilisatoren sind z. B. Phosphate (Yuan et al., 1997b) und Dipikolsäure (Quick and Harrison, 2010). Kommerzielle Produkte in wässriger Lösung beinhalten unterschiedliche prozentuale Anteile an PES. In diesem Fall werden die Stabilisatoren verdünnt und das Originalgleichgewicht verändert. Neben der Hydrolyse kann PES spontan oder Metall-katalysiert degradieren (Yuan et al., 1997a). Beide Reaktionen finden wie folgt statt:



Als Ergebnis der Degradierung sind alle Bestandteile des Gleichgewichts biologisch abbaubar und umweltunschädlich. Verglichen mit anderen oxidierenden traditionellen Desinfektionsmitteln wie z. B. Ozon oder Hypochloriden wird PES als geringer fischtoxisch (Crebelli et al., 2005; Reiser et al., 2010) und umweltschädlich betrachtet (Wagner et al., 2002). Aus diesem Grunde wurden PES als Alternative zur Behandlung von Abwasser (Kitis, 2004), als Bleichmittel (Yuan et al., 1997a), zur Frucht- und Gemüsedesinfektion (Alvaro et al., 2009), zur Desinfektion in Krankenhäusern (Loukili et al., 2006) und zur Behandlung von Ballastwasser etabliert (de Lafontaine et al., 2009). In den letzten Jahren wurden zunehmend Anstrengungen unternommen um PES in der Aquakultur als alternatives Desinfektionsmittel zu etablieren.

1.2. Peressigsäure in der Aquakultur

Erste PES-Studien mit Fischpathogenen wurden *in vitro* durchgeführt. Verschiedene Fischpathogene wurden mit verschiedenen PES-Produkten in unterschiedlichen Konzentrationen *in vitro* getestet (Marchand et al., 2012; Picon-Camacho et al., 2012; Straus and Meinelt, 2009; Straus et al., 2012). PES ist in Konzentrationen von 1 mg/l in der Lage, verschiedenste Fischpathogenen zu bekämpfen (Pedersen et al., 2013). Auch *in vivo* Studien mit ausgewählten Fischpathogenen wurden durchgeführt (Jussila et al., 2011; Sudová et al., 2010). Der Effekt von PES ist auf die Haut- und Kiemenoberfläche sowie das umgebende Wasser beschränkt. Unter der Hautoberfläche befindliche Parasiten werden durch eine PES-Hygenisierung oftmals nicht erreicht (Meinelt et al., 2009). Der Grund besteht darin, dass viele Fischpathogene Lebenszyklen mit verschiedenen Lebensstadien durchlaufen, die mehr oder weniger sensibel auf eine PES-Hygenisierung reagieren. Über die Bekämpfung einzelner Lebensstadien ist die Eindämmung von Fischpathogenen mittels PES *in vivo* jedoch prinzipiell möglich.

Zur Sicherstellung effektiver PES-Konzentrationen muss die Degradierung der PES-Produkte untersucht werden. In wässrigen Lösungen folgt die Degradierung dem exponentiellen Zerfall erster Ordnung (Pedersen et al., 2009). Die Salinität, die Wasserhärte und gelöste organische Substanzen (DOC) steigern den Zerfall der PES (Liu et al., 2014). Da Aquakultursysteme sehr diverse Wasserparameter aufweisen, wird auch die Degradierung der eingesetzten PES-Produkte sehr unterschiedlich sein. Aus diesem Grunde werden anlagenspezifische Hygenisierungsstrategien empfohlen.

In der Aquakultur wurde PES zuerst in geschlossenen Kreislaufanlagen verwendet. Im Prinzip zerfällt PES in RAS innerhalb weniger Stunden nach Applikation (Pedersen et al., 2009). Auf Grund seiner bakteriziden Wirkung können nitrifizierende Bakterien der Biofilter in RAS durch PES beeinträchtigt werden. Untersuchungen zur Minimierung des potentiellen Einflusses der PES wurden durchgeführt. Expositionen mit PES-Konzentrationen unter 1 mg/l hatten keinen Einfluss auf die Biofilter (Pedersen et al., 2009). Konzentrationen über 1 mg/l

PES können angewandt werden, wenn der Biofilter im Bypass betrieben wird.

Ein anderes praktisches Problem der Applikation von PES in RAS ist die Verteilung der PES bei unterschiedlicher hydraulischer Beaufschlagung. Ungleiche Verteilungen der Substanz können zu Überdosierungen bzw. Unterdosierungen in bestimmten Bereichen der RAS führen. In RAS mit Rundbecken kann eine gleichmäßige Verteilung der PES mittels Belüftung erreicht werden. Dahingegen ist in Rinnen-basierten RAS eine gleichmäßige PES-Exposition nur schwierig zu erreichen. (Pedersen and Pedersen, 2012). Ein "single-spot" und eine schnelle Zugabe der PES resultiert in Überdosierung an der Zugabestelle sowie PES-freien Fließabschnitten. Eine "multi-spot"- und langsame Applikation sichert eine gleichmäßige Verteilung des Wirkstoffs.

1.3. Vergleich der Peressigsäure mit anderen in RAS genutzten Desinfektionsmitteln

Ozon war das erste in RAS genutzte Desinfektionsmittel. Ozon ist in Konzentrationen von 0.01 mg/l toxisch für Fische (Summerfelt and Hochheimer, 1997). Obgleich Ozon innerhalb weniger Sekunden zerfällt, sind die durch Ozon erzeugten chemischen Verbindungen (OPO) chronisch toxisch. Die Exposition mit OPO >0.06 mg/l erzeugt irreversible Kiemenschäden und erhöhte Kiemen-mRNA Expression (Reiser et al., 2011). Ultraviolette Strahlung (UV) ist zur Reduzierung der Bakterien im RAS-Wasser ebenso effektiv. Die Effektivität von UV ist durch die Turbulenz im Wasser (Gullian et al., 2012) und die Schwebstoffe begrenzt (Sharrer et al., 2005). Um das Problem zu lösen wird UV kombiniert mit Ozon angewandt um bakterizide Effekte zu erreichen (Sharrer and Summerfelt, 2007). Erst kürzlich wurde niederfrequenter Ultraschall (LFUS) zur Desinfektion in RAS untersucht (Bazyar Lakeh et al., 2013). Die Autoren bemerken eine effektive Inaktivierung von Parasiten wie Ciliaten, Nematoden und Krustaceen durch LFUS. Nebenbei konnte die Effektivität von UV durch die Zerstörung der Schwebstoffe und der darin persistierenden Bakterien gesteigert werden. Dennoch ist LFUS für Fische in hoher Intensität gefährlich (Cobo et al., 2014). Das potentielle chronische Gefahrenpotential bleibt bislang jedoch unbekannt. Aus diesem Grund müssen die Desinfektionseinrichtungen von den Fischen isoliert werden und Oberflächen-gebundene

Pathogene können nicht bekämpft werden. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist ein nachhaltiges Desinfektionsmittel da es Hydroxylradikale freigibt und anschließend zu Wasser zerfällt. Die Anwendung von H_2O_2 in RAS ist durch die sehr hohe effektive Dosis und die potentielle Gefahr der Schädigung der Filterbakterien begrenzt. Die empfohlene Dosis zur Desinfektion beträgt ≥ 15 mg/l H_2O_2 die sichere Konzentration für die Biofilter < 5 mg/l (Pedersen und Pedersen, 2012). Dahingegen sind 1 mg/l PES ausreichend um die meisten Fischpathogene *in vitro* abzutöten (Pedersen et al., 2013). Diese Dosis hat keinen Effekt auf die Ammonium- und Nitrit oxidierenden Bakterien in den RAS (Pedersen et al., 2009). Aus diesem Grund besitzt PES große Vorteile gegenüber anderen Desinfektionsverfahren.

1.4. Toxizität von Peressigsäure gegen Fische

Die Anwendung von PES in der Aquakultur als Desinfektionsmitte führt zwangsläufig zu einer Exposition der Fische. Zur Vermeidung von Schäden wurde die Toxizität von PES gegen Fische ermittelt. Marchand et al. (2013) ermittelten 24-h-LC₅₀ von PES in Abhängigkeit von der Wasserhärte gegen Zebraabälblingesembryonen (*Danio rerio*) von 2.24 - 7.14 mg/l. Straus et al. (2012) bestimmten die 24-h-No Observed Effect Concentration (NOEC) von PES mit 2.2 mg/l für Dottersackbrut und 1.3 mg/l für frei schwimmende Brut des Kanalwelses (*Ictalurus punctatus*). Höhere Konzentrationen verursachten Schädigungen des Kiemengewebes und nachfolgend Mortalität. Diese Studien belegen die akute Fischtoxizität von PES. Auch potentiell chronische Effekte von PES wurden untersucht. PES und seinen Abbauprodukten wurde jedoch eine fehlende Mutagenität bestätigt (Crebelli et al., 2005).

1.5. Ziele der vorliegenden Studie

Obwohl vorangegangene Studien die sichere Anwendung von PES in RAS belegen, wurde ein abnormales Verhalten der Fische nach PES-Desinfektion beobachtet. Dieses Verhalten impliziert, dass die Fische Stress durch die PES-Exposition erfahren könnten. Eine regelmäßige prophylaktische Desinfektion in RAS wird jedoch empfohlen. Chronischer Stress könnte die Folge dieser Desinfektionsmaßnahmen sein. Es ist bislang unbekannt, ob sich

Fische an diese Art Stress adaptieren können, oder ob sie unter diesem leiden. Stress kann zu Energieverlusten führen (Gregory and Wood, 1999) und nachfolgend die Immunabwehr beeinträchtigen (Tort, 2011). Aus diesem Grunde könnte die regelmäßige PES-Desinfektion eventuell zu immunsuppressiven Effekten führen und das Wachstum der Fische beeinträchtigen. Diese Fragestellung zu beantworten war Inhalt vorliegender Studie.

2. Materialien und Methoden

2.1. Chemikalien

Es wurden zwei technische PES-Produkte geprüft. Wofasteril[®] E400 (Kesla Pharma Wolfen GmbH, Greppin, Germany) besteht aus 40% PES und 12% m/v H₂O₂. Das Aqua Oxides (S. SØRENSEN – THISTED, Thisted, Denmark) besteht aus 18% PES und 12% H₂O₂. Zusätzliche Chemikalien waren reinsten Grades und wurden lokal bezogen.

2.2. Experimentelles Design

2.2.1. Test 1: Effekt von Peressigsäure auf Karpfen in Massenproduktion-RAS

Karpfen (*Cyprinus carpio*) wurden von einer lokalen Fischfarm bezogen und 3 Monate in Quarantäne gehalten, bevor sie in die RAS gesetzt wurden. Die RAS bestand aus einer Haltungseinheit, einer mechanischen und biologischen Filtereinheit. Die Haltungseinheit wurde vor dem Besatz desinfiziert. Sie bestand aus 16 parallel in zwei Reihen angeordneten Becken. Jedes Becken mit einem Wasservolumen von 300 l wurde mit 6 Karpfen besetzt und kontinuierlich belüftet. Die Karpfen wurden über 6 Monate akklimatisiert und während dieses Zeitraums mit kommerziellen Karpfenpellets (1% der Biomasse täglich) gefüttert. Die Wassertemperatur betrug 21-22°C, der pH 7.3-7.7 und der Sauerstoffgehalt 8-8.5 mg/l. Acht Becken einer Reihe dienten als Negativkontrolle, die anderen 8 Becken als Expositionsgruppen. Den Behandlungsgruppen wurde je Becken zweimal wöchentlich 750 µl Wofasteril[®] E400 appliziert. Dies entsprach einer PES-Konzentration von 1 mg l⁻¹. Der Kontrollgruppe wurde 750 µl destilliertes Wasser appliziert. Die Wasserzirkulation wurde über 3 h während der Exposition gestoppt. Die Karpfen wurden nach der ersten Exposition

einmal je Monat beprobt (n=12). Blut wurde mittels Spritze aus der Caudalvene der Fische entnommen. Der Hematokrit wurde nach Zentrifugation bei 1000 g über 5 min in den Kapillarröhrchen bestimmt.

Nach der Blutentnahme wurde 6 Karpfen jeder Gruppe getötet. Länge, Breite und Biomasse wurden bestimmt. Die Kopf- und Rumpfniere wurden aseptisch entnommen. Anschließend wurden sie durch ein steriles Sieb (70 µm, Easy strainer) passiert und in geeistem Waschmedium suspendiert (RPMI-1640 mit Phenolrot + 10% Destilliertem Wasser + 100 U/ml Penicillin-streptomycin + 2 mM L-Glutamin + 25 mM HEPES Puffer + 10 U/ml Heparin, 0,22 µm sterile filtriert). Der zweite Kiemenbogen der rechten Seite wurde für histologische Untersuchungen entnommen.

Zwischen den Probennahmen wurden Wasserproben in einem zufälligen Becken jeder Gruppe vor und 3 h nach der Behandlung mit PES in zwei zufälligen Wochen genommen. Die Koloniebildende Einheit (KBE) der Wasserproben wurden nach der Methode beschrieben von Meinelt et al. (2015) bestimmt.

2.2.2. Test 2: Effekt von Peressigsäure auf Karpfen in Pilot-RAS

Zwanzig Karpfen (649 ± 183 g) wurde in einer Pilot-Kreislaufanlage gehalten. Das System bestand auf einem Fischhaltungsbecken (1000 l), einem Reservebecken (600 l) und einem Biofilterkomplex (400 l). Der Biofilter beinhaltete Bürsten Schwämme und Kies. Die Sedimente im Reservoir und Biofilterkomplex wurden wöchentlich entfernt und das Wasser ausgetauscht. Die Anlage hatte eine Durchflussrate von 10 l/min. Die Tag/Nacht-Photoperiode betrug 12/12 Stunden. Die Beleuchtung erfolgte mit OSRAM L 18W/865 Tageslicht (OSRAM GmbH, Munich, Germany). Die Wassertemperatur betrug 20 ± 1 °C; der pH war $7,7 \pm 0,3$ und die Sauerstoffkonzentration 8 - 9 mg/l. Die Karpfen wurden über 3 Monate an die Kreislaufanlage adaptiert und mit 1% der Körpermasse gefüttert.

Wofasteril[®] E400 wurde mit einer nominellen Konzentration von 1 mg/l PES in den Haltungsbecken aller 3 - 4 d über 5 Wochen exponiert. Das Wasser wurde in 1-l-Glasflaschen am Auslauf der Becken nach jeder zweiten Applikation gesammelt. Bei jeder Probenahme

wurde Kontrollwasser (0 h) und zwei Wasserproben direkt nach Applikation entnommen. Nach der Applikation wurden weitere Proben (n=3) nach 0.5, 1, 2, 4, 6 und 24 h genommen. Akustische und visuelle Störungen der Karpfen wurden während der Applikation und der Probenahme vermieden. Die Fütterung wurde zwei Tage vor Applikation eingestellt. Während der PES-Applikationen ohne Probennahme wurde die Degradierung von PES und H₂O₂ in den Becken bestimmt. Zum Verständnis der Verteilung von PES in den Becken wurde ein Modell, basierend auf der Hypothese, dass sich PES gleichmäßig verteilt und die Hydrolyse vernachlässigbar ist, entwickelt.

$$d/dt (C_1)=Q/V_1*(C_3 - C_1)$$

$$d/dt (C_2)=Q/V_2*(C_1 - C_2)$$

$$d/dt (C_3)=Q/V_3*(C_2 - C_3)$$

In diesen Gleichungen sind C₁, C₂, C₃ und V₁, V₂, V₃ die PES-Konzentrationen und Wasservolumina in den Fischbecken, dem Reservoir und der Filtereinheit; Q ist die Fließrate. Das anfängliche C₁ war 2 mg/l PES, während das anfängliche C₂ und C₃ 0 mg/l PES betrug.

2.2.3. Test 3: Effekt von Peressigsäure auf Regenbogenforellen in Durchflusssystemen

Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit einer mittleren Masse von 100 g wurden vom Biomar research center (Hirtshals, Denmark) bezogen und in einer Durchflussanlage (DTU-Aqua, Hirtshals, Denmark) gehalten. Diese Durchflussanlage besteht aus 9 identischen Haltungsbecken (Wasservolumen: 180 l). 20 Fische per Becken wurden über 3 Wochen akklimatisiert und anschließend sortiert. Die betäubten Fische (KALMAGIN 20%, Centrovvet, Chile) wurden individuell gewogen und sortiert. 18 Fische je Becken derselben Gewichtsklasse (11,83 ± 0.14 kg) wurden gleichmäßig auf die 9 Becken verteilt. Anschließend erfolgte wiederum eine Akklimatisierung der Fische über eine Woche. Pellets (EFICO Enviro 920, 4.5 mm, Biomar) wurden mittels Rotationsfütterer mit 0,8% der Biomasse gefüttert. Jedes Becken wurde mit einem Belüftungsstein belüftet. Eine Pumpe (EHEIM Compact 1000) stellte den radialen Fluss im Becken sicher. Der Zufluss betrug konstant 20 l/h. Die Temperatur betrug 13 °C und die Sauerstoffsättigung 80-100% (gemessen mit OxyGuard®

Handy Polaris). Die neun Becken wurden zufällig in drei Gruppen aufgeteilt. Die Pulsbehandlungsgruppe erhielt 1,053 ml Aqua Oxides (1 mg/l PES) 2 mal pro Woche. Die Gruppe mit kontinuierlicher Behandlung wurde kontinuierlich aus einer Stammlösung (1:500) Aqua Oxides mit einer Fließrate von 0,195 ml/min exponiert. Dies entsprach einer nominellen Konzentration von $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ PES am Zufluss. Der kontinuierliche Zulauf wurde durch eine Peristalticpumpe (ISMATEC® BVP Standard, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Germany) und PharMed® Ismaprene Schläuchen realisiert. Die Kontrollgruppe erhielt keine PES-Gaben. Wasser aus den Becken wurde während der ersten Pulsbehandlung in den ersten 4 Wochen gesammelt. Das Wasser wurde direkt vor Applikation sowie 1, 2, 4, 8, 24, 28, 32 und 48 h *post applicationem* mittels 1-l-Glasflaschen entnommen. In der 5. Woche erfolgte zusätzlich die Stressung aller Fische für 90 sec durch Netzfang. Wasserproben wurden vor sowie 1, 2, 4 h nach dem Stress entnommen.

Nach 6 Wochen Behandlung wurde die Fische betäubt und die Biomasse bestimmt. Zwei zufällig ausgewählte Fische wurden getötet und Masse, Länge und Breite bestimmt. Die gesamte Leber wurde zur Bestimmung des Leber-Somatischen-Index (LSI) entnommen und gewogen. Die Kopfniere wurde aseptisch entnommen durch ein steriles Sieb (70 μm , Easy strainer) passiert und in geeistem Waschmedium suspendiert (RPMI-1640 mit Phenolrot + 10% Distilliertem Wasser + 100 U/ml Penicillin-streptomycin + 2 mM L-Glutamin + 25 mM HEPES Puffer + 10 U/ml Heparin, 0,22 μm steril filtriert).

2.3. Bestimmung der PES- und Wasserstoffperoxidkonzentration

Die Methode zur Bestimmung der PES und H_2O_2 Konzentrationen war die DPD (N, N-diethyl-p-phenylendiamine sulfate Salz) photometrische Methode (Liu et al. (2015)). Ohne Peroxidase, wird das transparente und farblose DPD durch PES in DPD^+ transformiert. Dieses erscheint pink und hat eine maximale Absorption bei 550 nm. Durch Zugabe von Peroxidase wird DPD durch PES und H_2O_2 oxidiert. Zur Messung der PES Konzentration werden 1 ml der PES Probe und 500 μl Pufferlösung (bestehend aus 30,25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 23 g KH_2PO_4 , 0,01 g NaCl, und 0,5 g KI in 1000 ml H_2O) gemischt und in eine Plastikkyvette überführt.

Anschließend werden 500 µl der DPD Lösung (bestehend aus 1,6 g DPD, 200 µl 97% H₂SO₄, und 0,02 g EDTA in 100 ml H₂O) zugegeben. Nach 30 sec, wird die 550 nm Absorption-A mit einem DU®800 Spectrophotometer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany) bestimmt. Für die gemeinsame Messung von PES und H₂O₂ wurde die gleiche Prozedur und die gleiche Wellenlänge genutzt um die Absorption B zu erreichen. Statt Puffer A wurde Puffer B verwendet (5 mg Peroxidase, Practical Grade 2, A3800; Applichem® GmbH, Darmstadt, Germany) in 100 ml Puffer Lösung A. Absorption-A stellt die Konzentration an PES dar, während Absorption-B die Konzentration von PES und H₂O₂ repräsentiert. Die Standard Kurve zwischen der 550-nm Absorption und der PES-Konzentration wurde mit einem Modell der linearen Regression dargestellt.

2.4. Stressmonitoring der Fische

Cortisol als ein Stressindikator wurde im Wasser bestimmt. Cortisol im Wasser wurde nach Extraktion mit einem Elisa test kits (IBL international GmbH, Hamburg, Germany) bestimmt. Die Extraktion folgte dem Testprotokoll von Brüning et al. (2015) mit leichten Modifikationen. Generell wurde jede Kartusche mit 5 ml Methanol aktiviert und mit 5 ml Reinstwasser gereinigt, bevor die 1 l Wasserprobe mit einer Durchflussrate von 10 ml/min durch die Kartusche gepumpt wurde. Nachfolgend wurden die Kartuschen mit 5 ml Reinstwasser gereinigt. Schlussendlich wurde das Cortisol mit 5 ml Ethylacetat gelöst und in einem Wasserbad (40 °C) unter einem N₂ stream verdampft. Im Versuch 2 wurde die Extraktion automatisch mit einem Dionex™ AutoTrace™ 280 Festphasenextraktionsinstrument mit 6 ml Dionex™ SolEx™ C18 Silica-Based SPE Cartridges (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Im Versuch 3 wurde die Extraktion manuell mit einer Peristaltischen Pumpe (ISMATEC® BVP Standard, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Germany) mit Sep-Pak C18 Plus Kartuschen (Waters, Eschborn, Germany) durchgeführt. Die verdunsteten Cortisol Proben wurden in 0.5 ml Phosphate gepufferter Salzlösung (PBS + 5% Ethanol + 0,1% Rinder Serum Albumin, 0,22 µm steril filtriert) vor der Messung rückgelöst.

2.5. Messung der angeborenen zellulären Immunität

Zellsuspensionen der Niere wurden bei 400 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Leukozyten-angereicherte Schicht wurde mittels steriler Pasteurpipette in ein neues steriles Zentrifugengefäß überführt und zurückgelöst (RPMI-1640 ohne Phenol rot + 100 U/ml Penicillin-streptomycin + 2 mM L-Glutamin + 25 mM HEPES Puffer [+10% destilliertem Wasser im Versuch 1], 0,22 µm steril filtriert). Die neue Suspension wurde zweimal mit eiskaltem Medium gewaschen. Nachfolgend wurde die Zelldichte der Suspension mit einem Hämozytometer (Neubauer improved, Brand GmbH, Wertheim, Germany) auf 10^7 Zellen/ml justiert bevor die Suspensionen in sterilen 96-cell-wells (Nunc, 100 µl Zell Suspension per Well mit 6-8 Replikaten) ausgebracht wurden. Die Platten wurden in einer Feuchtekammer über Nacht inkubiert (22°C im Versuch 1, 17 °C im Versuch 3). Die nicht adherenten Zellen wurden entfernt.

Zu Bestimmung des respiratorischen Bursts (NBT assay), wurde 100 µl frisches Kulturmedium gelöst mit 1 mg ml^{-1} Nitrobluetetrazolium (NBT) bei Umgebungstemperatur zu jedem Cellwell dazugegeben. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 1 µg/ml) wurde als Stimulanz der Hälfte der Replikate genutzt. Die Platten wurden in die Feuchtekammer zurückgestellt und für eine Stunde (Versuch 1) oder 3 h (versuch 3) inkubiert. Nachfolgend wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 100% Methanol fixiert und 2 mal mit 70% Methanol gewaschen. Die getrockneten Wells wurden mit 100 µl dimethyl sulfoxide (DMSO) und 100 µl 2M KOH zur Lösung des Formazans zugegeben. Die Absorption wurde bei 620 nm mit dem Plattenreader (Tecan Genios) bestimmt.

Die Vitalität der angehefteten Leukozyten wurde parallel bestimmt. Zur Messung der Zellvitalität (MTT Assay) wurden 100 µl frisches Zellkulturmedium mit 0,5 mg/ml Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) bei Raumtemperatur zu jedem Cellwell dazugegeben. Die Platten wurden in die Feuchtekammer zurückgestellt und genau so lange wie das NBT Assay inkubiert. Nachfolgend wurde das Medium verworfen und die Cellwells getrocknet. Das Formazan wurde in 100 µl alkalischem DMSO (27 µl 2M KOH gelöst in 10 ml DMSO) gelöst und die Absorption wurde bei 570 nm mit einem Plattenreader (Tecan Genios) nach

Mischung gemessen. Zusätzlich wurde ein MTT Assay mit den angehefteten Leukozyten nach einer Inkubation von 96 h (Test 1) oder 72 h (Test 3) ohne Stimulanzen durchgeführt. Das Ergebnis wurde mit den initialen MTT Assays verglichen und die Überlebensrate errechnet.

Zur Messung der Stickoxid (NO) Produktion wurde frisches Kulturmedium mit 4% fetalem Rinderserum (Holzkohle gefiltert, GeneTex) gelöst und bei Raumtemperatur auf die Kopfnierenplatten aufgebracht (150 µl je Well). Lipopolysaccharid (LPS, 30 µg/ml) wurde als Stimulanz verwendet. Die Platten wurden in die Feuchtekammer zurückgestellt und für 96 h bebrütet. Nachfolgend wurden die Platten bei 100 g für 2 min zentrifugiert. Das Supernatant wurde in Duplikaten (50 µL) auf neues 96-Well Platten transferiert und mit 50 µl Griess Reagenz (1% Sulfanilamid + 0,1% n-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride gelöst in 2,5% H₃PO₄) gemischt. Nach Dunkelinkubation bei Raumtemperatur für 10 min wurde die Absorption bei 540 nm (Tecan Genios) bestimmt. Natriumnitrite in Konzentrationen von 0-100 µM wurden als Standard verwendet.

2.6. Histologische Analyse der Kiemen

Kiemenbögen wurden unmittelbar nach der Entnahme in Kassetten eingebettet und in Bouin'scher Lösung für 24 h fixiert. Nachfolgend wurde die Bouin'sch Lösung verworfen und durch 100% Ethanol ersetzt. Das Ethanol wurde alle 24 h dreifach erneuert. Die Kiemenproben wurden in einem Shandon™ Excelsior™ Tissue Processor entwässert bevor sie manuell in Paraffinblocks eingebettet wurden. Die Kiemenproben in den Blocks wurden über 5-8 h entkalkt. Anschließend wurden sie in einem Rotationsmikrotom auf eine Dicke von 3,5 µm geschnitten. Die Schnitte wurden in ein Wasserbad (45°C) überführt, auf Objektträger platziert und auf einer Wärmeplatte getrocknet (45°C). Schlussendlich wurden alle Schnitte mit HE gefärbt und mit Roti®-Histokitt II (Carl Roth) verklebt.

Alle Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop bei 60-facher Vergrößerung evaluiert. Je Sample wurden auf je 6 Slides je 10 Sekundärlamellen der inneren Sektion untersucht. Proliferationen/Hyperplasien wurden in zwei Regionen, primäre Filamente/Interlamellarraum und sekundäre Filamente/distale Enden der Filamente,

untersucht. Das Anheben von Epithel und das Auftreten von eosinophilen granuläre Zellen wurden bewertet.

Der Schweregrad der Veränderungen wurde beurteilt. Die Anzahl der Schichten der Epithelzellen definiert die Schwere der Hyperplasie. Bis zu 3 Schichten wurden als minimal beeinträchtigt angesehen. 4 bis 7 Schichten wurden als moderat und ≥ 8 wurden als schwer betrachtet. Die Anzahl eosinophiler Zellen wurde in die Beurteilung des Schweregrades mit einbezogen: 1 bis 4 galten als minimal, 5 bis 8 waren moderat und ≥ 9 waren als schwer anzusehen.

2.7. Statistics

Unabhängige t-tests und one-way ANOVA wurden genutzt, um zwei oder mehrere Gruppen zu vergleichen. Im Falle ungleiche Varianzen, wurde eine Welch's ANOVA anstatt einer one-way ANOVA verwendet. Alle Tests wurden mit Hilfe von SPSS Statistics 21 (IBM, Chicago, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Test 1

3.1.1. Fundamentale physiologische Parameter

Die Biomasse und das Längen/Breiten-Verhältnis der Kontroll- und Expositionsfische war ähnlich ($P > 0,05$). Die Hämatokritwerte der Kontroll- und Expositionsfische war ähnlich mit der Ausnahme der dritten Probenahme nach PES-Behandlung von 2 Monate. Hier wiesen die Behandlungsgruppen leicht höhere Hämatokritwerte als die Kontrollfische auf (Abb. 1, $P = 0,037$).

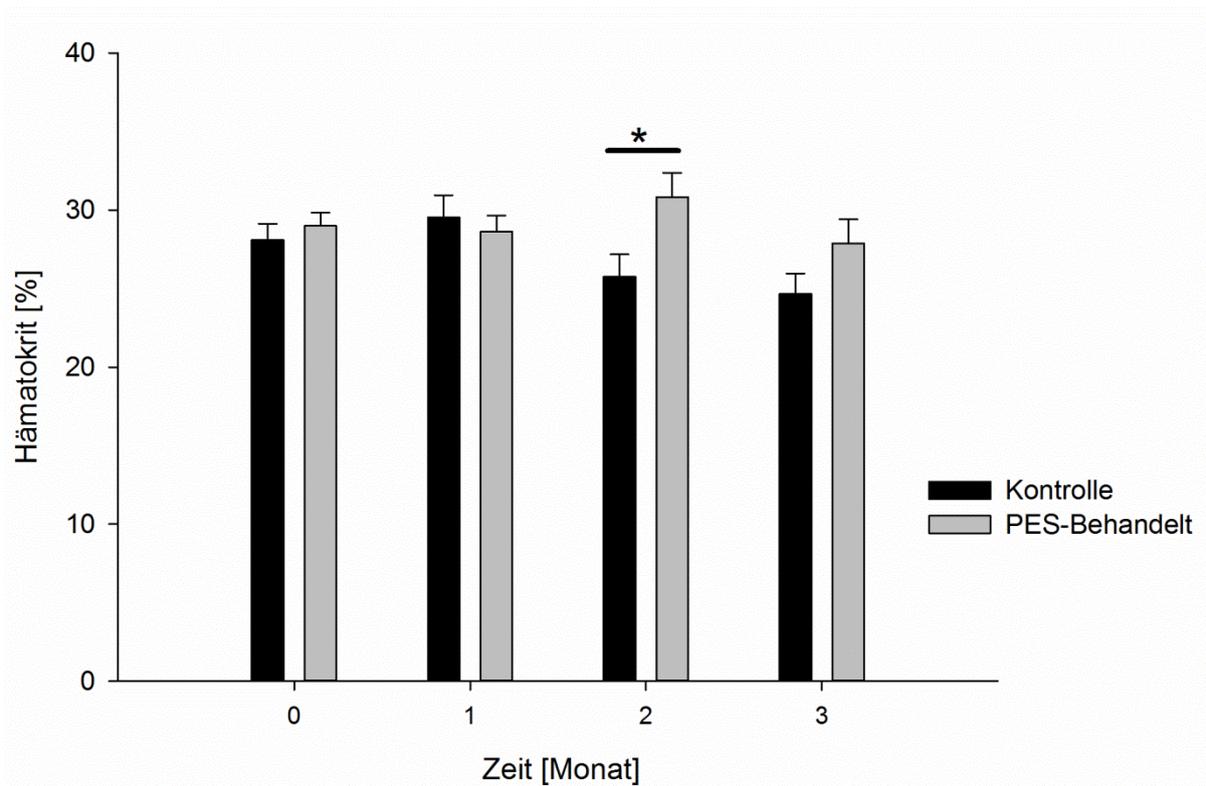


Abb. 1: Hämatokrit von den PES-behandelten Karpfen und der Kontrolle innerhalb 3 Monate. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. *: $P < 0,05$

3.1.2. Kiemenhistologie

Die Kiemen der Expositionsgruppen wiesen signifikant weniger Veränderungen auf als die der Kontrollgruppe. Der hauptsächliche Unterschied zwischen Kontroll- und Expositionsgruppe bestand in dem Schweregrad der eosinophilen Granulozyten. Höhere Schweregrade der eosinophilen Granulozyten wurde in der unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet (Abb. 2).

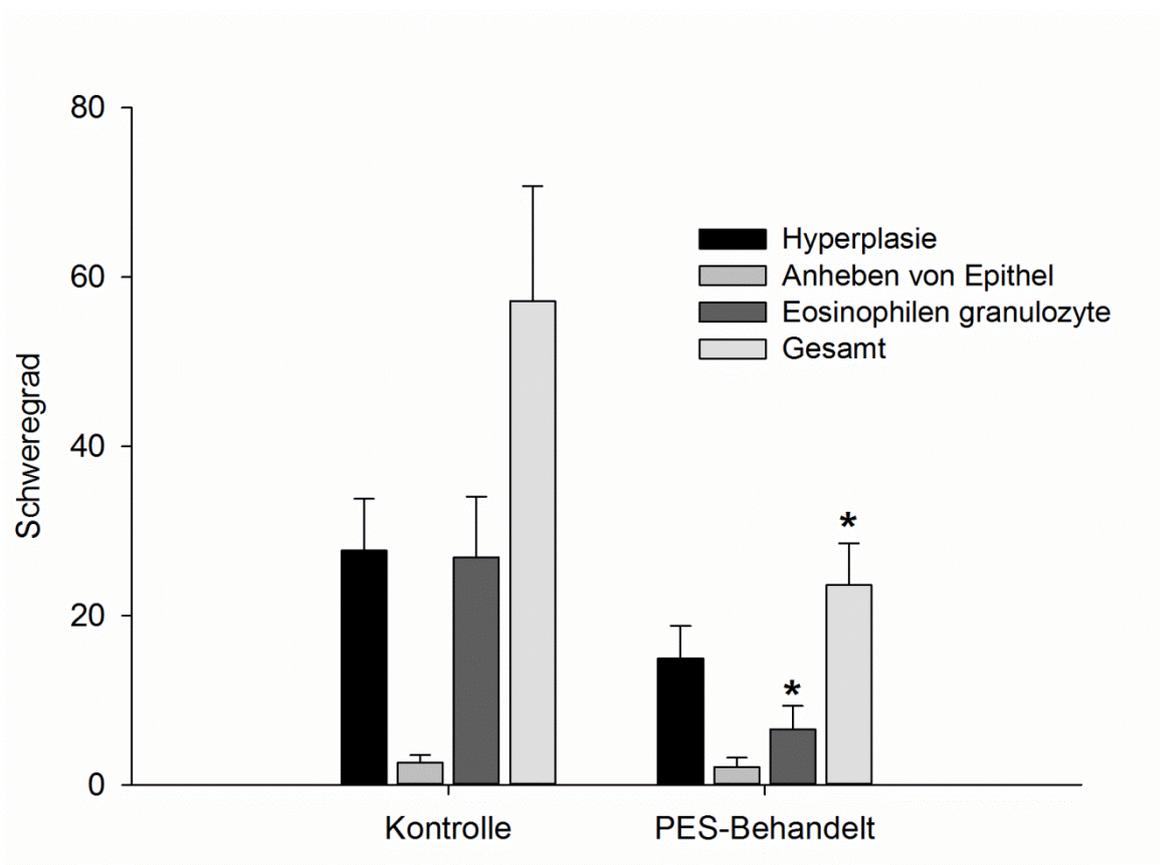


Abb. 2: Schweregrad von Hyperplasie der Epithelzellen, Anheben von Epithel und Auftreten von eosinophilen Granulozyten der Kiemen der Kontrolle und den PES-behandelten Karpfen.

*: $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.3. KBE im Haltungswasser

Die KBE vor der Behandlung mit PES bleibt stabil um 2.000-3.000 /ml und änderte sich nicht im Lauf der Zeit. Die KBE der Kontrolle und der PES-behandelten Gruppe waren vor der Behandlung mit PES ähnlich. Nach 3 h der Behandlung mit PES stieg die KBE der Kontrolle 5-8 fach. Im Gegensatz dazu senkte die KBE der PES-behandelten Gruppe 80-90% (Abb. 3).

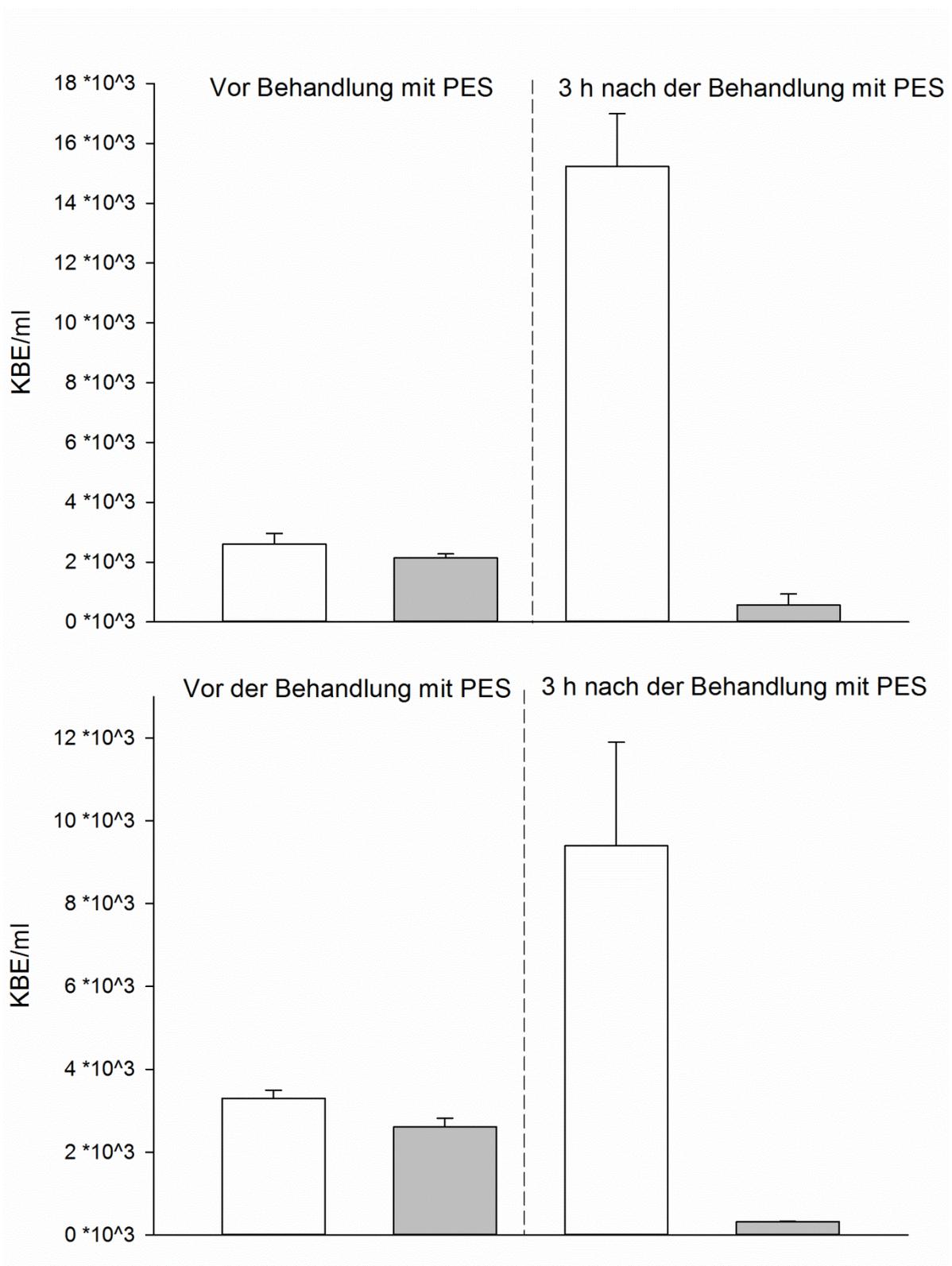


Abb. 3: Die KBE im Haltungswasser der Kontrolle (weißer Balken) und der PES-behandelten Gruppe (grauer Balken) vor und 3 h nach der Behandlung mit PES in zwei zufälligen Wochen.

Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

3.1.4. Angeborene zelluläre Immunität

Der respiratorische Burst der Leukozyten der Kopf- und Rumpfnieren war in den meisten Fällen zwischen Kontroll- und Expositionsgruppe gleich. Der Stimulationsfaktor (SF) von PMA auf den respiratorischen Burst der Leukozyten der Kopf- und Rumpfnieren war generell zwischen Kontroll- und Expositionsgruppe ähnlich. Eine Ausnahme des SF von PMA auf den respiratorischen Burst der Leukozyten während der 3. Probereihe (nach PES-Behandlung von 2 Monate) stellte die Rumpfnieren dar, welche in der Behandlungsgruppe höher als in der Kontrollgruppe war ($P=0,003$, Abb.4).

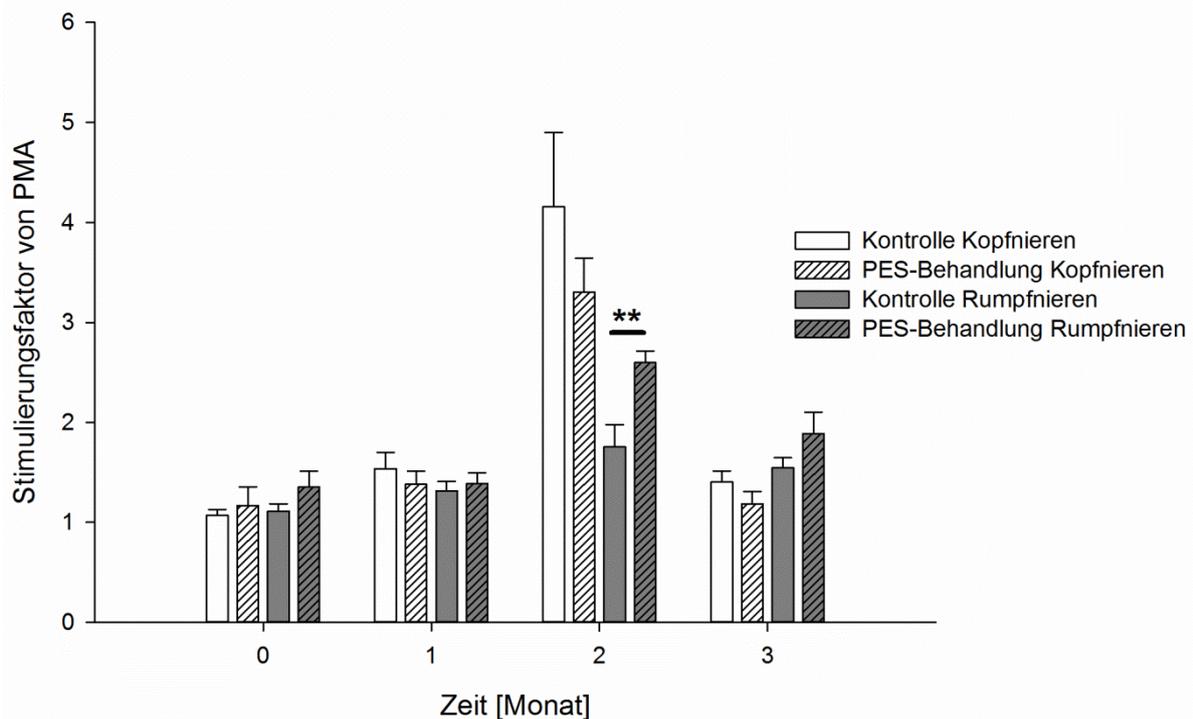


Abb. 4: Stimulierungsfaktor von PMA auf dem respiratorischen Burst der Leukozyten aus der Kopf- und Rumpfnieren in der Kontrolle und der PES-Behandlungsgruppe. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. **: $P < 0,01$

Die Bestimmung von Stickoxidproduktion war nur für S3 erfolgreich. Unabhängig davon,

ob die Leukozyten zuvor mit LPS stimuliert wurden oder nicht, konnte zwischen den Gruppen kein Unterschied festgestellt werden ($P=0,707$ oder $0,665$). Gleiches gilt für den SF von LPS auf die NO Produktion von Leukozyten der Kopfniere ($P=0,931$). Es wurde weiterhin kein Unterschied in der 96-h-Überlebensrate der Leukozyten der Kopfnieren festgestellt ($P=0,131$).

3.2. Test 2

Nach Applikation von PES erhöhte sich die Cortisolkonzentration vorübergehend. Bei wiederholter Applikation verringerten sich jedoch die Cortisol Spitzenkonzentrationen (Abb. 5). Der Anstieg erfolgte schneller, jedoch während der nachfolgenden Messreihen weniger ausgeprägt. Während der ersten Messreihe wurde diese Verringerung nicht beobachtet, da die Proben nicht nach einem Zeitraum von 6 h genommen wurden. Bei den Messreihen des Wassercortisols erfolgte die Abschwächung bei aufeinanderfolgenden Messungen früher. Während der fünften Messreihe nahm die Cortisolkonzentration nach PES Applikation innerhalb von 30 min ab.

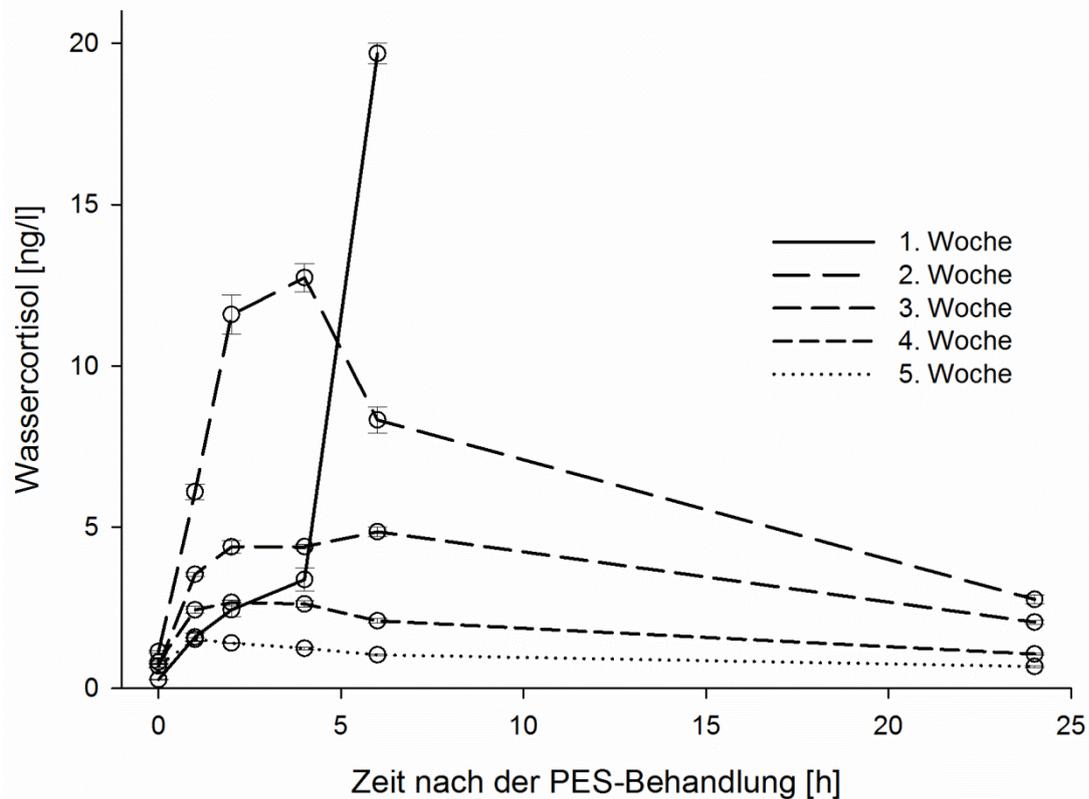


Abb. 5: Wassercortisolkonzentration 0,5, 1, 2, 4, 6 und 24 h nach der PES-Behandlung. Die 24-h Probe wurde in der 1. Woche nicht genommen. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Die grundlegende Cortisolkonzentration (Basalwert, 0 h) verblieb nach der zweiten Messreihe erhöht (ANOVA, $F_{4,25}=60,579$, $P<0,001$) und stabilisierte sich auf ein mittleres Level nach der dritten Messreihe (Tukey Test, $P=0,244$). Nach 24 h war die Cortisolkonzentration immer höher als der entsprechende Basalwert (unabhängiger T-Test, $df=10$, $P<0,001$). Eine Ausnahme davon bildet die fünfte Messreihe, bei der beide Konzentrationen gleich waren (unabhängiger T-Test, $df=10$, $P=0,738$, Abb.5)

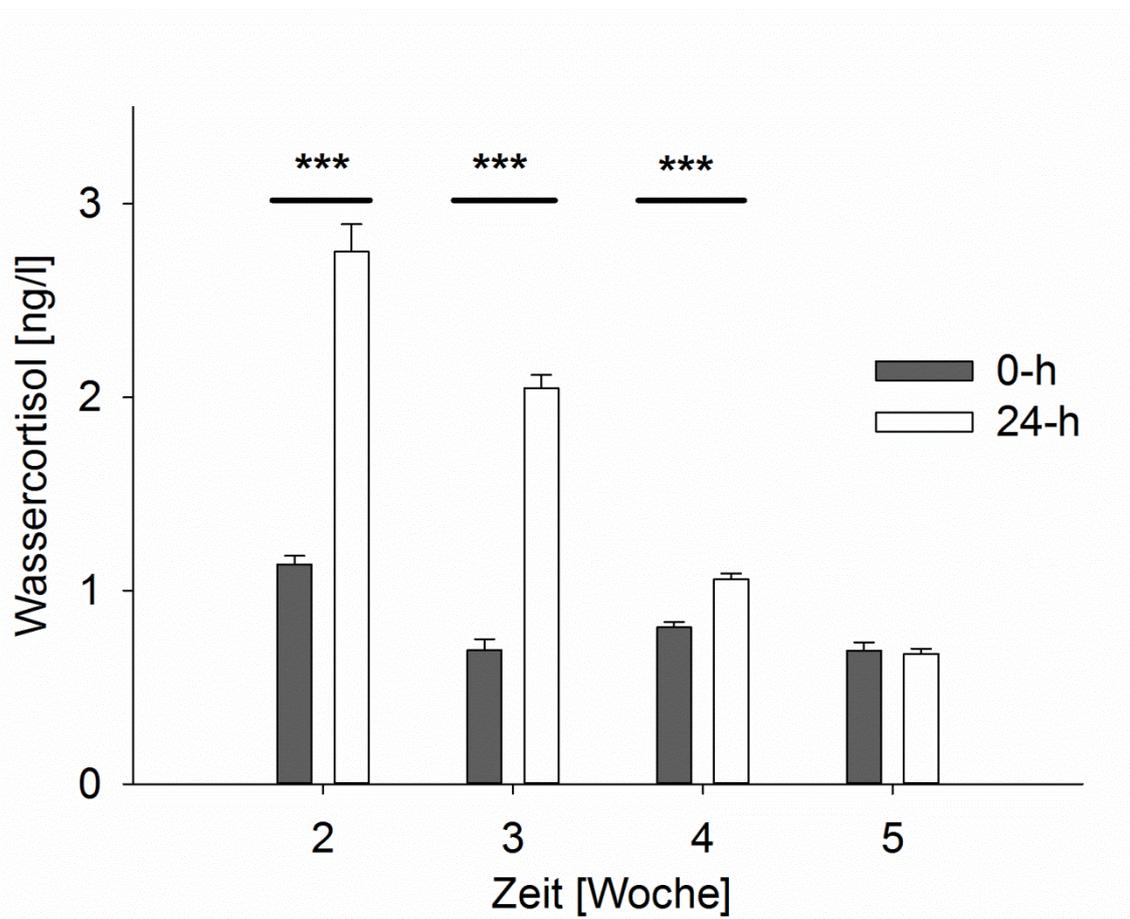


Abb. 6 Vergleich der Wassercortisolkonzentration am Anfang (0 h) und 24 h jeder Messzeit.
 ***: $P < 0,001$ zwischen 0 und 24 h. Fehlerbalken zeigen sich der Standardfehler.

PES degradierte innerhalb von 6 h nach Applikation nahezu vollständig (Reaktion zweiter Ordnung, $r^2 > 0,999$), H_2O_2 degradiert hingegen langsamer. Nach 6 h verblieben noch etwa 40 % H_2O_2 im Wasser (Abb.7). Unserem Model folgend, wurde PES langsam von der Fischkultureinheit zum Reservoir Tank und Biofilterkomplex verteilt. Eine gleichmäßige Verteilung von PES im gesamten System war nach etwa 150 min erreicht (Abb.8).

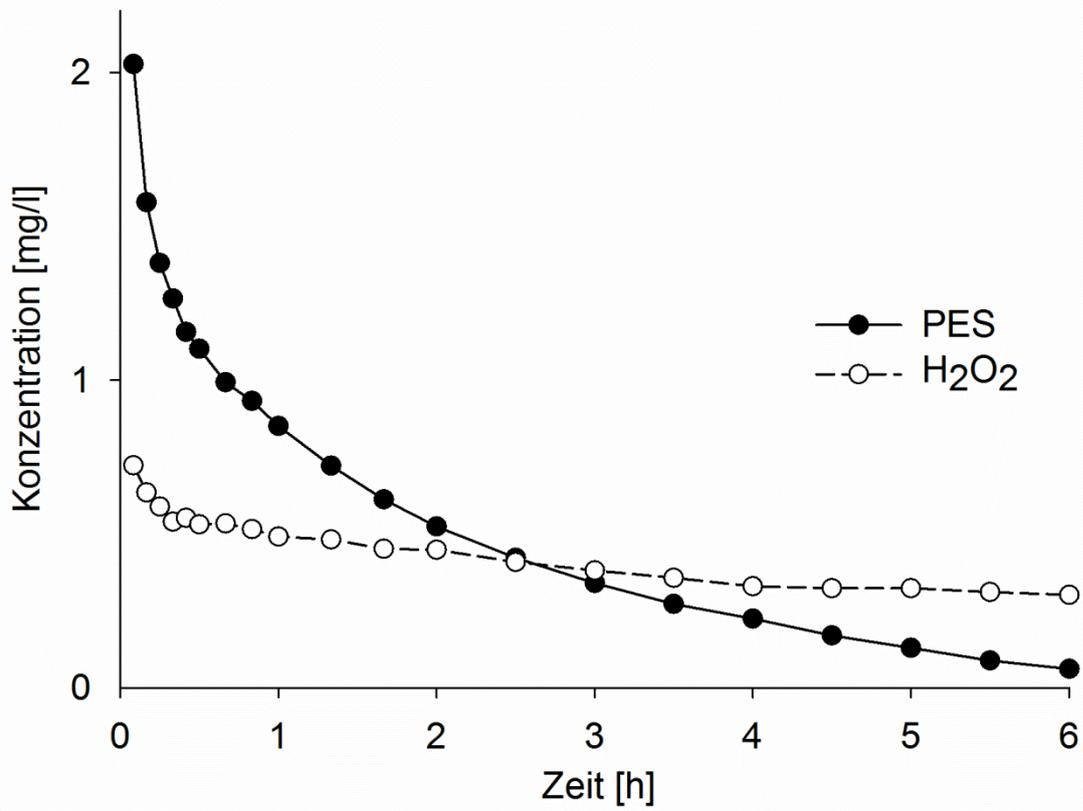


Abb.: 7 Zerfall von der PES und H₂O₂ in Fischhaltungstank innerhalb 6 h nach PES-Applikation.

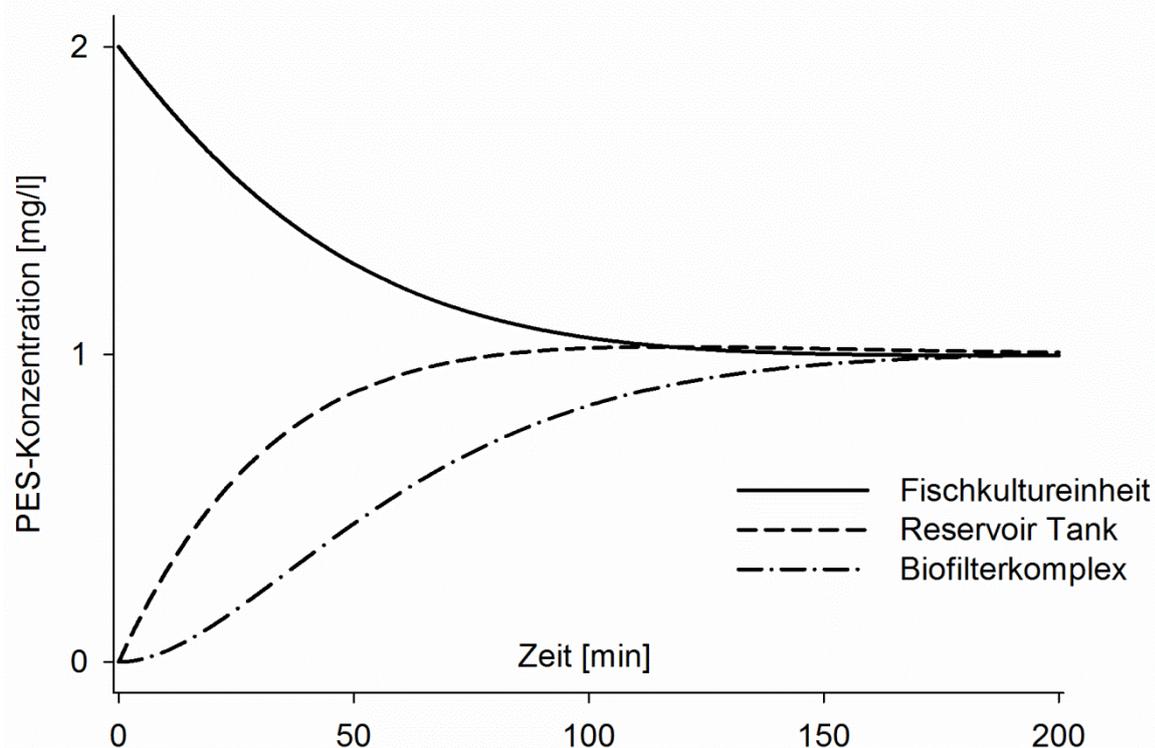


Abb. 8: Theoretischer Verteilungsmodell der PES im Pilot-RAS, wobei der Zerfall der PES ignoriert wurde.

3.3. Test 3

3.3.1. Wassercortisol

Das Wassercortisol der Kontrollgruppe unterlag einem täglichen Rhythmus. Die Konzentration stieg morgens leicht an, erreichte mittags ihr Maximum und fiel zum Nachmittag wieder ab. Dieser Rhythmus war innerhalb der 4 Messwochen stabil. Die Wassercortisolkonzentration der kontinuierlich behandelten Gruppe wies einen vergleichbaren Rhythmus auf. Im Gegensatz dazu wurde bei der Pulsbehandlungsgruppe ein signifikanter Anstieg nach der ersten PES Applikation gemessen. Die Wassercortisolkonzentration war in Relation zu den beiden anderen Gruppen für mehrere Stunden erhöht. Während der folgenden Wochen verringerte sich dieser Anstieg jedoch und wurde geringfügig (Abb.9). Weiterhin wiesen die Fische Verhaltensänderungen als Reaktion

auf der Pulsbehandlung von PES auf. Sie schwammen aktiver anstatt nur sich lediglich an die radiale Strömung anzupassen. Intensität und Dauer dieser Verhaltensänderung nahm mit wiederholter PES-Applikation ab.

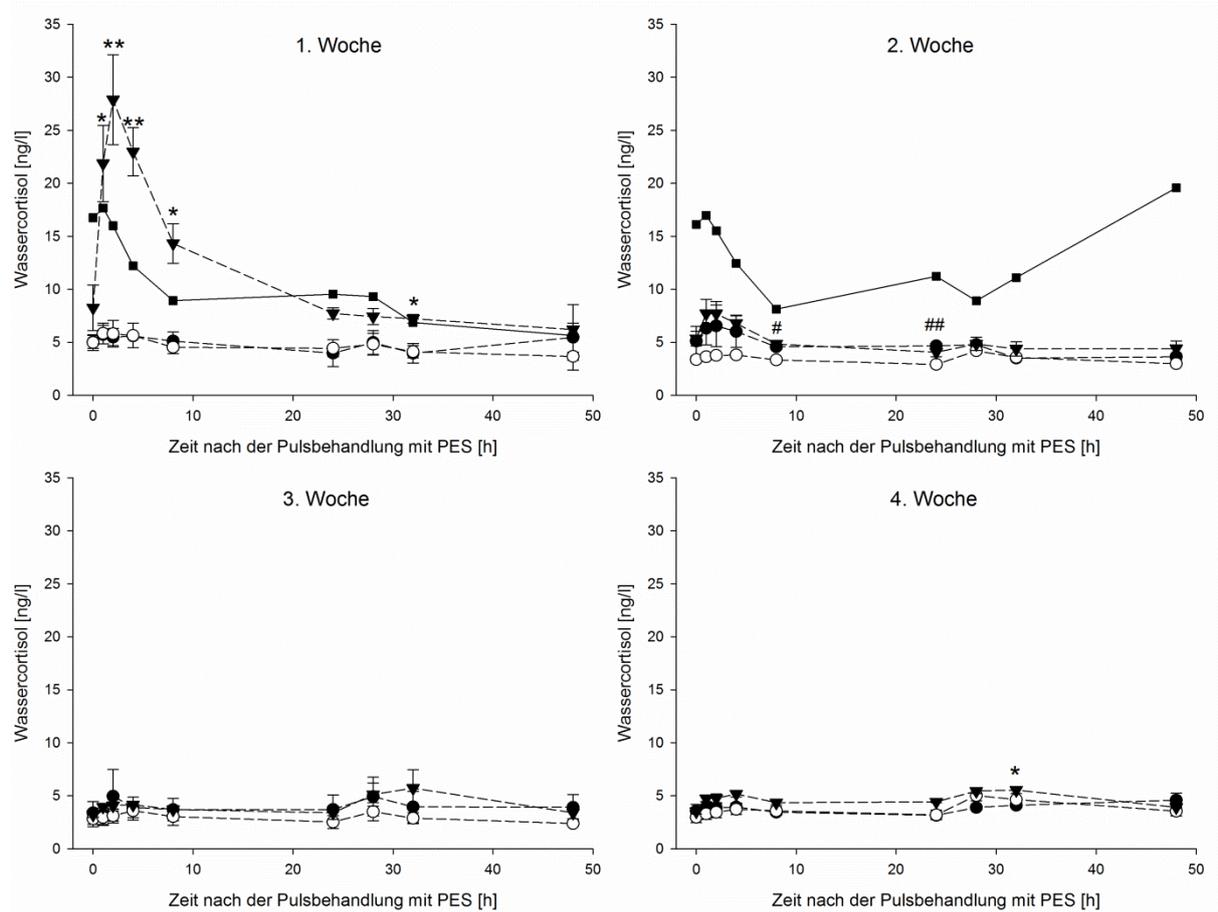


Abb. 9: Die Wassercortisol der Kontrolle (●), der kontinuierlichen behandelten Gruppe (○) und der Pulsbehandlungsgruppe (▼) in der ersten 4 Wochen. ■: Ausreißer in der Kontrolle. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. * and **: $P < 0,05$ bzw. $0,01$ zwischen der Kontrolle und der Pulsbehandlungsgruppe. # und ##: $P < 0,05$ bzw. $0,01$ zwischen der Kontrolle und der kontinuierliche behandelten Gruppe.

Innerhalb der ersten zwei Wochen und der fünften Woche wurden zufällig auftretende Ausreißer festgestellt. Die Ausreißerbecken hatten höhere Wassercortisolkonzentrationen und andere Verhaltensmuster als die anderen Replikate. Die Regenbogenforellen in diesen Becken wiesen langfristiges abnormales Verhalten auf. Bei einigen wurde jagen und beißen

beobachtet, während sich andere mit abwärts gerichtetem Kopf auf den Beckenboden drückten. Die Regenbogenforellen in den anderen Becken zeigten friedliches Schwarmverhalten.

Nach der Applikation des zusätzlichen Stressor in der 5. Messwoche stieg die Wassercortisolkonzentration in allen Gruppen an. Der proportionale Anstieg war dabei in allen Gruppen gleich ($P=0,578$). Weiterhin waren Steigung und Ordinatenabschnitt der linearen Regression der Cortisol-Zeit-Gleichung in allen Gruppen ähnlich ($P=0,7585$ bzw. $0,0617$, Abb.10).

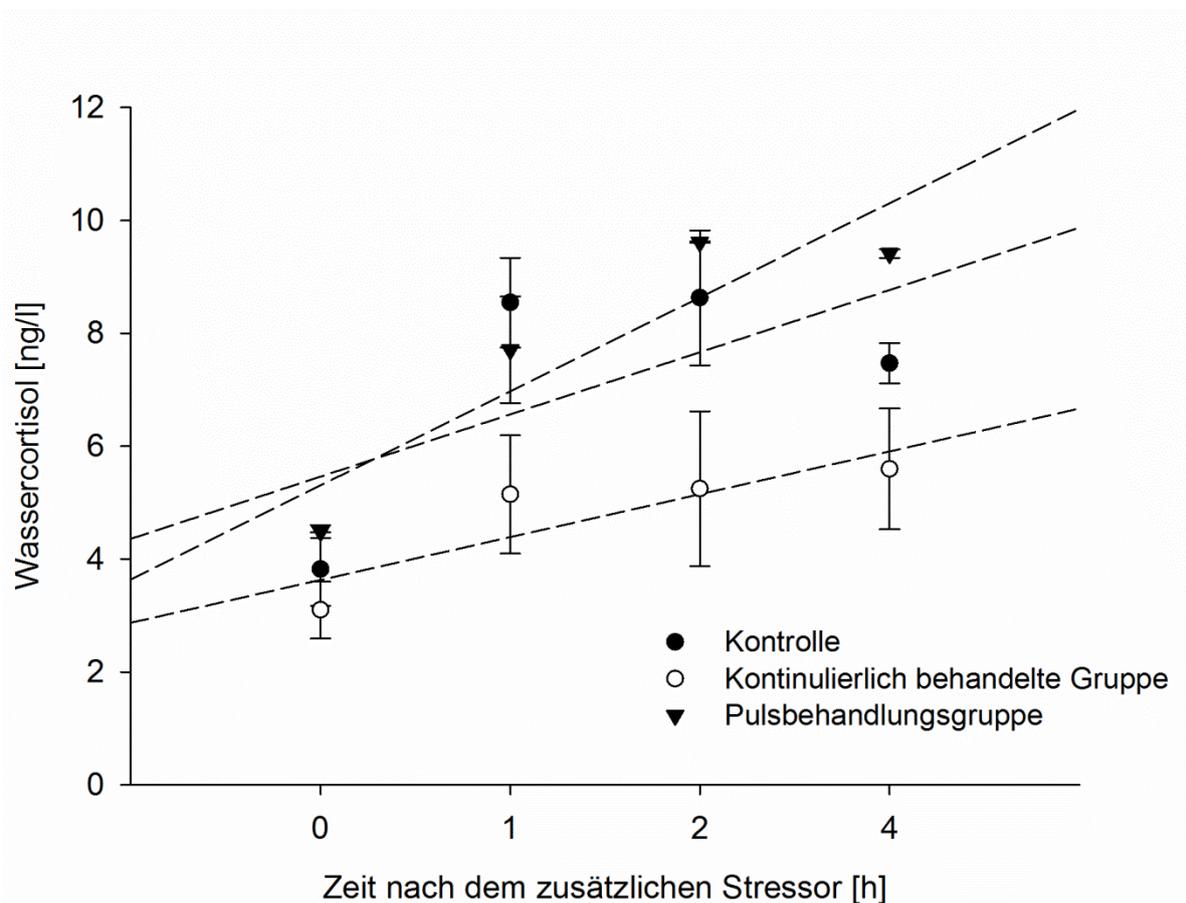


Abb. 10: Wassercortisol der Kontrolle, der kontinuierlichen behandelten Gruppe und der Pulsbehandlungsgruppe innerhalb 4 h nach dem zusätzlichen Stressor (Netzfang) in der 5. Woche. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die gepunkteten Linien stellt die interpretierte lineare Regression zwischen Zeit und Wassercortisolkonzentration dar.

3.3.2. Wachstum

Mortalität trat in keiner der Gruppen auf. Wachstumsrate und Futterkonvertierungsrate war in allen Gruppen gleich ($P=0,813$ bzw. $0,907$). Weiterhin konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen für das Längen/Breiten-Verhältnis und den Leber-Somatischen-Index nachgewiesen werden ($P=0,771$ bzw. $0,824$; Tabelle 1).

Tabelle 1: Wachstumsparameter aller Gruppen am Ende der Versuche

Parameters	Kontrolle	Kontinuierlich behandelt	Pulsbehandlung	P-Wert
Anfangbiomass [kg]	2,14±0,0306	2,126±0,0213	2,12±0,0306	0,694
Endbiomass [kg]	3,52±0,02	3,507±0,0115	3,507±0,0306	0,467
Wachstumsrate [%]	64,5±1,88	64,9±2,1	65,4±0,939	0,813
FCR	0,701±0,0116	0,701±0,0156	0,697±0	0,907
Leber-Somatischen-Index	0,0116±0.00089	0,0118±0.00144	0,0114±0.0011	0,865
Längen/Breiten-Verhältnis	3,864±0,105	3,848±0,198	3,792±0,22	0,853

FCR: Futterkonvertierungsrate

3.3.3. Angeborene zelluläre Immunität

Der respiratorische Burst war in beiden Expositions-Gruppen ähnlich dem der Kontrollgruppe (Abb. 11, $df=17$, $P=0,663$). PMA hatte in allen Gruppen den gleichen stimulierenden Effekt ($df=17$, $P=0,714$). Weiterhin bestand zwischen den Gruppen kein Unterschied in der Lebensfähigkeit und der 72-h Überlebensrate von Leukozyten der Kopfniere ($df=17$, $P=0,597$, $0,288$ bzw. $0,187$).

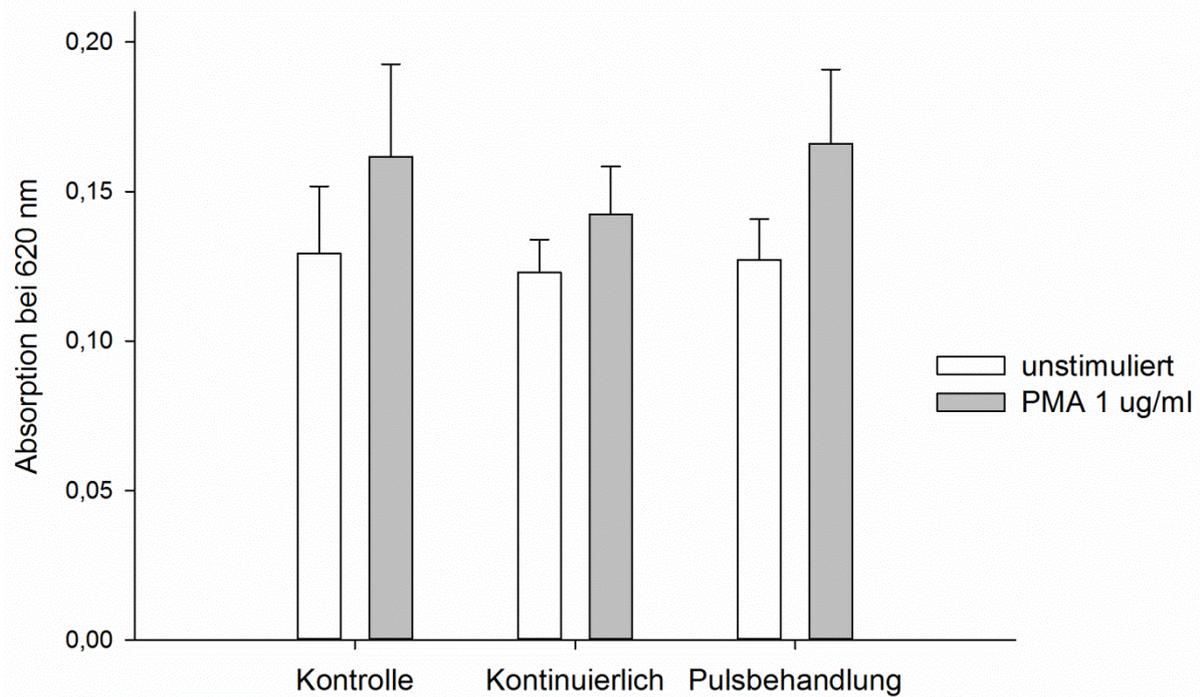


Abb. 11: Respiratorische Burst der Leukozyten der Kopfnieren in der Kontrolle, der kontinuierlich behandelten Gruppe und der Pulsbehandlungsgruppe am Ende der Versuche. Fehlerbalken zeigen sich der Standardfehler.

3.3.4. Wasserwerte

Der pH Wert des Wasser schwankte in allen Gruppen täglich um $\leq 0,2$. Eine leichte Absenkung trat nach der Fütterung auf, die anschließend wieder anstieg. Die Pulsbehandlung der PES führte zu einer vorübergehenden Absenkung des pH-Wertes unmittelbar nach der Zugabe, vergleichbar mit der durch die Fütterung hervorgerufenen. Während der vierten Woche war der pH der Kontrollgruppe geringer als in der ersten Woche. In der Pulsbehandlungsgruppe bleibt der pH hingegen über den gesamten Versuchszeitraum konstant. In der kontinuierlich behandelten Gruppe stieg der pH leicht (Abb.12).

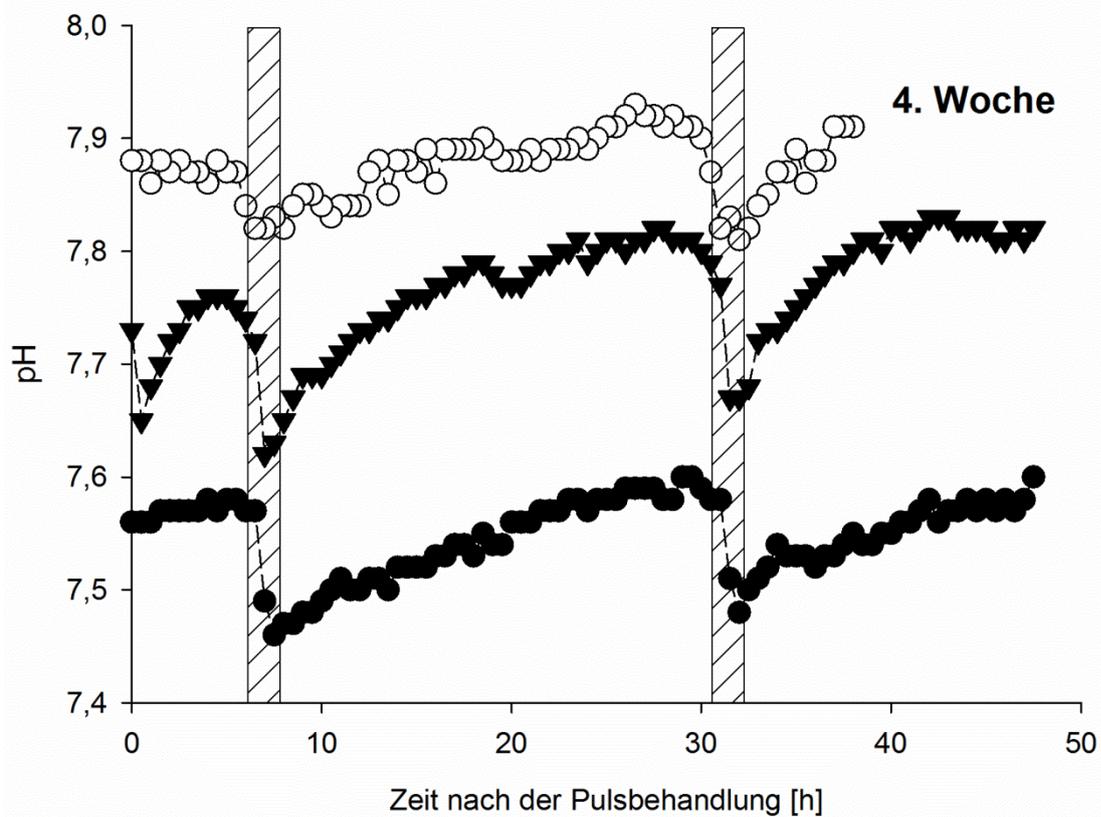
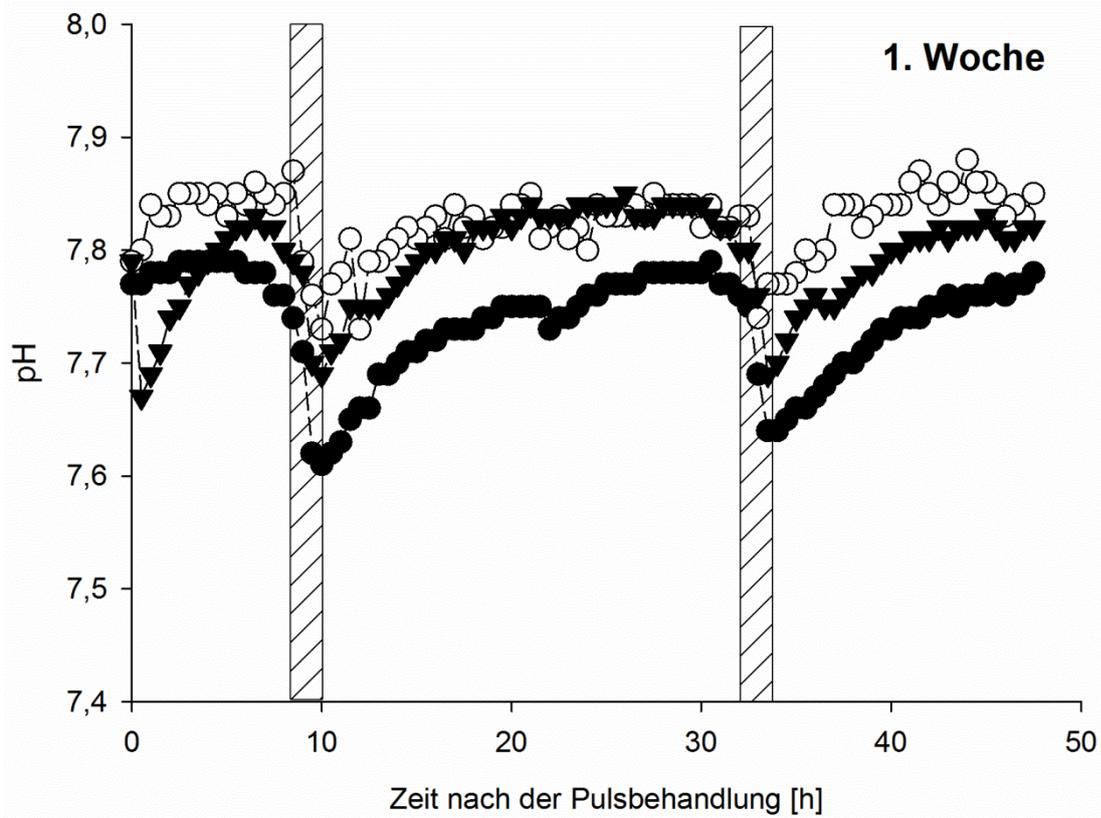


Abb. 12: Der pH-Wert von der Kontrolle (●), der kontinuierlichen behandelten Gruppe (○)

und der Pulsbehandlungsgruppe (▼) in der 1. und 4. Woche. Die gestreifte Balken stellen die Zeit der Fütterung dar.

Bei der Pulsbehandlungsgruppe war der Biofilm auf der Beckeninnenseite in Relation zur Kontrolle verringert, bei der kontinuierlich behandelten Gruppe hingegen verstärkt (Abb.13). Die Temperatur in allen Becken betrug konstant $13\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff war am bei der Pulsbehandlungsgruppe höchsten und in der Kontrollgruppe am geringsten (Abb.14, $P < 0,001$).

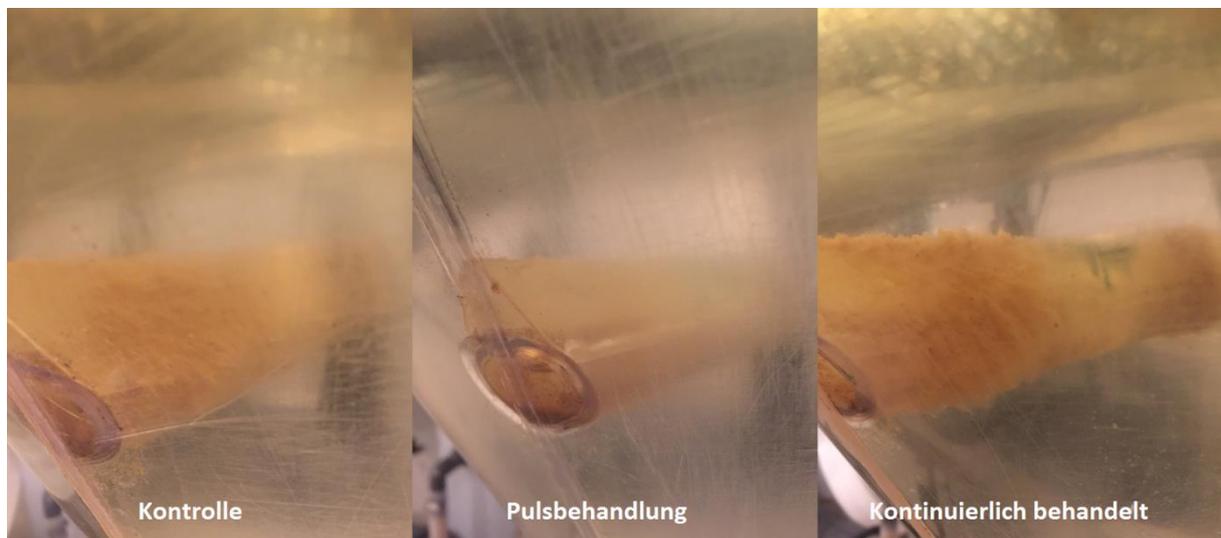


Abb. 13: Der Biofilm von der Kontrolle, der Pulsbehandlungsgruppe und der kontinuierlichen behandelten Gruppe am Ende der Versuche. Der Biofilm auf der Beckeninnenseite bei der Pulsbehandlungsgruppe wurde in Relation zur Kontrolle verringert, bei der kontinuierlich behandelten Gruppe hingegen verstärkt

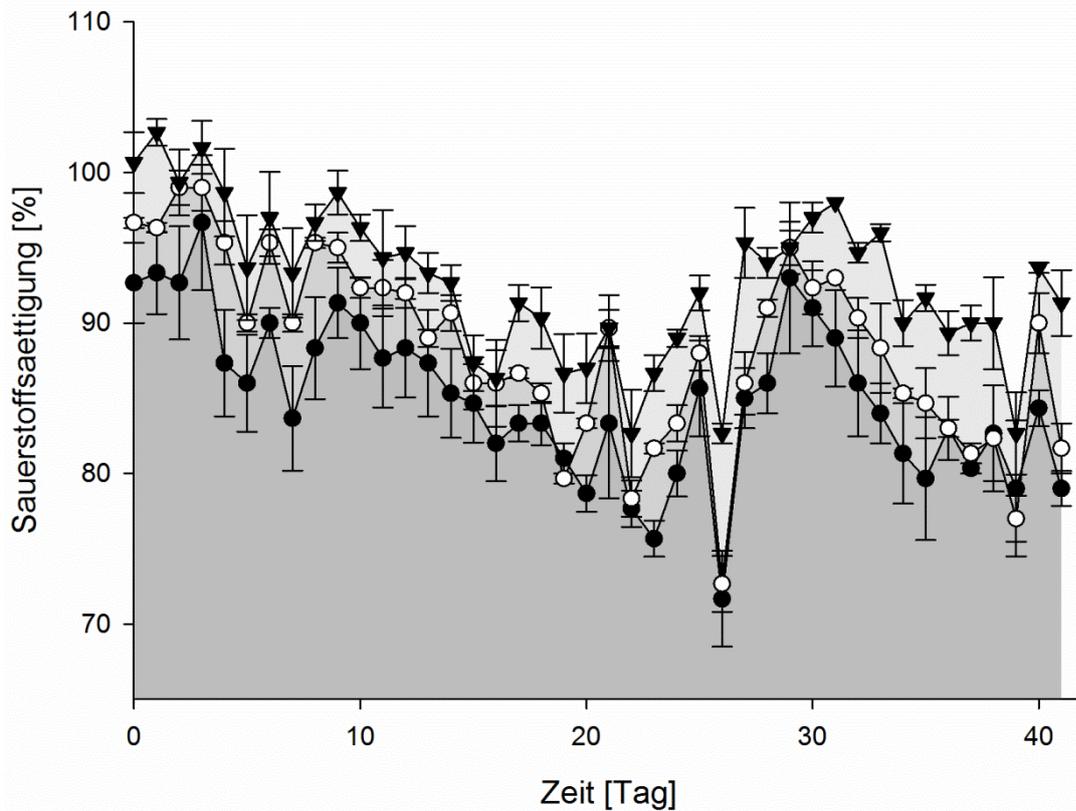


Abb. 14: Sauerstoffsättigungen der Kontrolle (●), der Kontinuierlich behandelten Gruppe (○) und der Pulsbehandlungsgruppe (▼) während der Versuche. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Unabhängig von der Zeit der Messung wies die kontinuierlich behandelte Gruppe ähnlich Werte an gelöstem Ammonium, Nitrat und Nitrit wie die Kontrollgruppe auf. In der Pulsbehandlungsgruppe wurden hingegen höhere Konzentrationen an Ammonium und Nitrit und niedrigere Nitratkonzentrationen gemessen (Abb. 15)

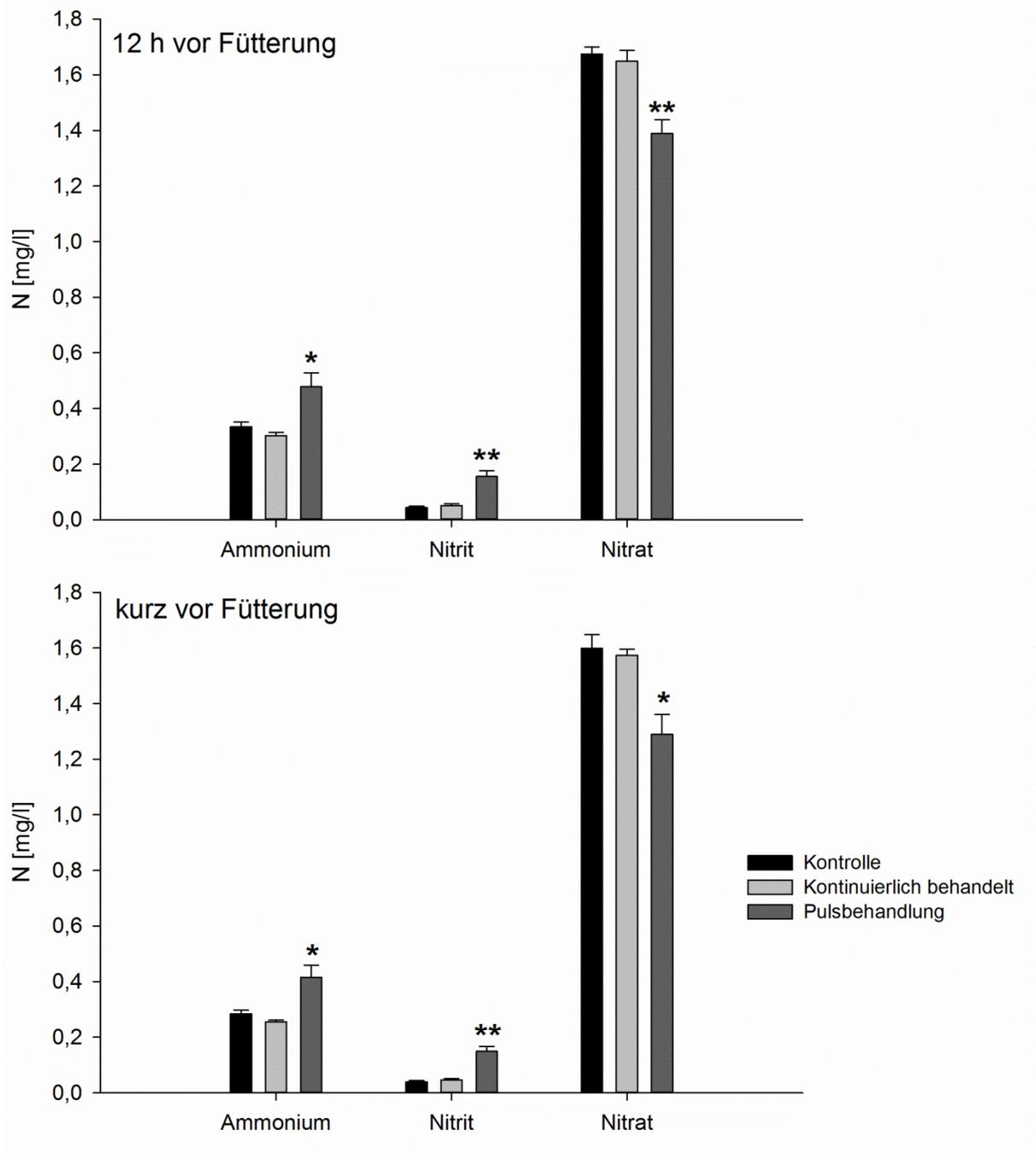


Abb. 15: Ammonium-, Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen von der Kontrolle, der kontinuierlich behandelten Gruppe und der Pulsebehandlungsgruppe kurz und 12 h vor Fütterung in der 6. Woche. Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. * und **: $P < 0,05$ bzw. $0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

Fünf Minuten nach erfolgter Pulsbehandlung wurden PES Konzentrationen von etwa 0,7

mg/l gemessen. Eine vollständige Degradierung war innerhalb von 5 h erreicht. Mit der oben beschriebenen Methode konnte bei der kontinuierlich behandelten Gruppe weder PES noch H₂O₂ nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Adaptation der Fische an Peressigsäure-induzierten Stress

Cortisol wird überwiegend über passive Diffusion von den branchialen Blutgefäßen der Kiemen ins Wasser abgegeben (Vermeirssen and Scott, 1996). Basierend auf dieser Theorie, wurde die Messung des Cortisol Gehalts des Wassers an Stelle des Plasma-Cortisols als verlässlicher Stressindikator für zahlreiche Fischarten etabliert und bewiesen (Ellis et al., 2004; Ellis et al., 2007; Fanouraki et al., 2008; Ruane and Komen, 2003; Scott and Ellis, 2007; Sebire et al., 2007; Wong et al., 2008). Die Messung des Wassercortisols wurde zunächst in Durchflussanlagen eingesetzt. Die Cortisol-Abgaberate (cortisol release rate; CRR) wurde dabei basierend auf der gemessenen Cortisolkonzentration am Austritt in Relation zur Wasseraustauschrate kalkuliert. Die CRR ist mit dem Plasmacortisolgehalt und auftretendem Stress korreliert positiv (Ellis et al., 2004). In RAS kann die Verteilung des Cortisol durch verschiedene Parameter beeinflusst werden. Dazu gehören die Beckengröße, Systemaufbau, Durchflussrate, chemische Oxidation und biologische Degradation. Mota et al. (2014) bewiesen dies, indem sie hohe Abweichungen im Cortisolgehalten in sieben verschiedenen RAS nachwiesen. Es ist daher nicht möglich, in RAS den CRR basierend auf den Wassercortisolkonzentration zu messen. Ungeachtet dessen, sollte die Änderung der Cortisolkonzentration im RAS Wasser positiv mit der Exkretion/Produktion von Plasmacortisol korrelieren. Die Konzentration des Cortisols im Wasser kann daher als Biomarker verwendet werden, der die Stressantwort in Fischen anzeigt.

Im Test 2 wurden nachfolgend zur PES Applikation, abnehmende Peaks für die Cortisolkonzentration gemessen. Dies weist darauf hin, dass die Plasmacortisolkonzentration ebenfalls abnahm. Dies könnte Resultat von inhibierter Cortisolproduktion, gesteigertem Cortisolkatabolismus oder beidem sein. Im Vergleich zur ersten Messreihe beobachteten wir

einen früheren Anstieg und schnelleren Abfall der Wassercortisolkonzentration in darauffolgenden Messungen. Dies weist darauf hin, dass sowohl Produktion als auch Metabolismus des Plasmacortisols durch wiederholte PES Zugabe gefördert wurden. Bei nachfolgenden PES Zugaben wurde weiterhin ein weniger ausgeprägter Anstieg der Wassercortisolkonzentration beobachtet. Während der fünften Messung (neunte PES Zugabe) stieg die Konzentration nur geringfügig an und kehrte innerhalb von 24 h auf das Basislevel zurück. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Karpfen sich an die PES-Behandlung adaptierten und bei wiederholter Zugabe eine schnellere, aber weniger ausgeprägte Stressantwort zeigten. Mortalität wurde während der Studie nicht nachgewiesen. Wenn das Experiment noch weiter fortgeführt worden wäre, hätten sich die Karpfen vermutlich vollständig an die PES Zugabe adaptiert und keine bzw. eine vernachlässigbar geringe Stressantwort gezeigt. Wir haben weiterhin festgestellt, dass der Basiswassercortisolwert nach PES Applikation mäßig anstieg. Dies könnte durch die Applikation hervorgerufen werden, jedoch sind hier weitere Untersuchungen notwendig. Goos and Consten (2002) fanden eine ähnliche Adaptation auf wiederholte Temperaturshocks bei männlichen Karpfen. Anzumerken ist, dass deren Kontrollgruppe eine Varianz der Plasmacortisolkonzentration mit der Zeit aufwies. Diese Abweichung ist vermutlich auf den circadianen Rhythmus des Plasmacortisols, der in vielen Fischarten gefunden wurde, zurückzuführen (López-Olmeda et al., 2012; Montoya et al., 2010; Oliveira et al., 2013). Selbst mit den im vorliegenden Experiment verwendeten festen Tag/Nacht Lichtperioden hat die angeborene biologische Variabilität der Fische kleine Fluktuationen des Cortisolgehaltes verursacht.

Im Test 3 hat die Pulsbehandlung mit PES in der ersten Woche eine starke Steigerung des Wassercortisols verursacht. Bis zum zweiten Tag nach der Applikation blieb die Konzentration relativ zur Kontrollgruppe erhöht. Zudem wiesen die Regenbogenforellen unmittelbar nach der PES Zugabe ein aktiveres Schwimmverhalten auf. Dies weist darauf hin, dass Regenbogenforellen durch die erste Pulsbehandlung in der ersten Woche gestresst waren. Im Gegensatz dazu führte die kontinuierliche Behandlung zu ähnlichen Wassercortisolwerten und Verhalten wie in der Kontrollgruppe. Dies belegt, dass

die kontinuierliche Applikation während der ersten Woche für die Regenbogenforellen stressfrei verlief. Grund dafür ist vermutlich, dass die PES Konzentration bei kontinuierlicher Applikation unterhalb des für Regenbogenforellen detektierbaren Grenzwertes lag. Ab der zweiten Woche war die Verhaltensreaktion der Regenbogenforellen auf die Puls-Anwendung noch immer erkennbar, jedoch kürzer und weniger intensiv. Dies weist darauf hin, dass Regenbogenforellen die Veränderungen in ihrer Umwelt, die durch Pulsbehandlung mit PES verursacht wurden, noch immer kognitiv wahrnehmen. Davon abgesehen wiesen alle Gruppen vergleichbare Wassercortisolkonzentration auf, was auf ähnliche Plasmakonzentration in allen Gruppen schließen lässt. Beide Behandlungsmethoden riefen daher ab der zweiten Woche keine Stressreaktion hervor.

Die Ergebnisse belegen, dass bei der ersten Exposition eine Konzentration von 1 mg/l PES in Regenbogenforellen eine Stressantwort induziert. Diese Stressantwort wurde jedoch bei darauffolgenden Expositionen runterreguliert. Erklärbar ist dies entweder mit Adaptation oder Erschöpfung. Wenn die Regenbogenforellen erschöpft sind ist es wahrscheinlich, dass sie verringertes Wachstum, supprimierte Immunität und reduzierte Stressantwort gegen weitere Stressoren aufweisen. In der vorliegenden Studie wiesen die Forellen der unterschiedlichen Gruppen jedoch vergleichbares Wachstum, Immunität und Stressantwort auf zusätzliche Stressoren (Netzfang) auf. Erschöpfung kann daher als Grund für die beobachteten Ergebnisse ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind daher Folge von Adaptation!

4.2 Einfluss der Sozialstruktur auf Wassercortisol

Im Test 2 wiesen alle Karpfen ein einheitliches Verhalten auf. Weder Kämpfe noch gegenseitiges jagen wurde beobachtet. Weiterhin wurden keine abnormalen Änderungen der Wassercortisolwerte während des Experiments gemessen. Im Gegensatz dazu wurden im Test 3 während der ersten beiden und der fünften Woche verschiedene Ausreißer in den Konzentrationen in verschiedenen Gruppen beobachtet. Die Regenbogenforellen in den Ausreißerbecken wiesen ein aggressiveres Verhalten als die anderen Wiederholungen der

gleichen Gruppe auf. Dies war die Konsequenz von sozialem Stress, der normalerweise in karnivoren Fischen auftritt. Dominante Fische können akuten und chronischen Stress bei untergeordneten Fischen induzieren (Jeffrey et al., 2014; Øverli et al., 1999; Sloman et al., 2001). In der vorliegenden Studie handelte es sich bei der Mehrheit der Regenbogenforellen in den Ausreißerbecken um untergeordnete Exemplare. Ihr Stressstatus führte zu abnormal hohen Cortisolkonzentration im Wasser.

4.3 Peressigsäure hat keinen Einfluss auf Wachstum und angeborene zelluläre Immunität

Im Test 3 wiesen Regenbogenforellen aller Gruppen die gleiche Wachstumsrate, Lever-Somatischen-Index und Futterkonvertierungsrate auf. Weiterhin wurde kein Unterschied in der Körpermorphologie (Längen zu Breiten Verhältnis) beobachtet. Abgesehen davon, dass die Forellen durch die erste PES Applikation gestresst waren, war die Energie, die ins Wachstum investiert wurde, nicht reduziert. Dies belegt, dass PES, sowohl bei wiederholter Pulsbehandlungen mit Konzentrationen von ≤ 2 mg/l als auch bei kontinuierlicher Behandlung mit geringer Konzentration ein minimaler Stressor für die Fische war und das Wachstum nicht beeinflusste.

In den Tests 2 und 3 wurden der respiratorische Burst und die Produktion von NO verwendet, um die Produktion von ROS durch die Nierenleukozyten zu evaluieren. Um die ROS Produktion zu stimulieren, wurden PMA oder LPS als Signale der Antigen Anerkennung verwendet. Bei beiden Tests wurde kein Unterschied zwischen den Stimulationsmethoden gefunden. Dies belegt, dass die Leberleukozyten die gleiche zelluläre Immunität besaßen, unabhängig davon, ob die Fische mit PES behandelt wurden oder nicht. Zusätzlich war die Überlebensrate der Leukozyten nach 72 h bzw. 96 h Inkubation zwischen PES-behandelten Tieren und Kontrolle identisch. PES hat daher keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Nierenleukozyten.

4.4 Einfluss von Peressigsäure auf die mikrobielle Aktivität des Wassers

Im Test 1 wurde durch eine Konzentration von 1 mg/l PES eine Reduktion der KBE

während des vorübergehenden Wasserstops festgestellt. Bakteriellles Wachstum wurde hingegen im unbehandelten Becken beobachtet. Nachdem erneutem Starten des Wasserflusses, kehrte die KBE rasch wieder auf den Basalwert zurück. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der antimikrobielle Effekt von PES lediglich während und kurz nach dem Wasserstop vorlag. Unabhängig von diesem Kurzeiteffekt war eine zweimalige Applikation pro Woche ausreichend, den Zustand der Kiemen zu verbessern. Es ist anzumerken, dass die Behandlung mit PES in den Aufzuchteinheiten keinen Effekt auf die mikrobielle Dichte in den Biofiltern hatte.

Der Biofilm (Periphyton) ist eine Matrix, die hauptsächlich aus Bakterien und Algen besteht (Rao, 2010; van Dam et al., 2002). Im Test 3 hat die wiederholte Pulsbehandlungen mit PES den Biofilm im Fischbecken fast vollständig entfernt. Grund dafür ist der universelle antimikrobielle Effekt von PES (Kitis, 2004). Die langsame Degradation von PES während der Pulsbehandlung war ebenfalls für eine effektive Desinfektion förderlich. Als Ergebnis davon war die totale mikrobielle Aktivität in der Pulsbehandlungsgruppe stark inhibiert. Dies traf auch auf die aerobe mikrobielle Respiration und Nitrifikation zu. Im Vergleich zur Kontrollgruppen wurden daher höhere Sauerstoffwerte und geringere Nitrifikation (höhere Ammonium- und Nitrit- sowie geringere Nitratwerte) gemessen. Weiterhin war die mikrobielle Aktivität so gering, dass der pH der Pulsbehandlungsgruppe innerhalb der 4 Wochen unverändert blieb.

Durch kontinuierliche Behandlung mit PES wurde der Biofilm der Beckeninnenseite verstärkt. Die Anwendung resultierte in nicht nachweisbaren Konzentrationen von PES, was durch die schnelle Degradation verursacht wurde. Als Abbauprodukte entsteht unter anderem Essigsäure, die eine Kohlenstoffquelle ist. Die Zugabe von Kohlenstoff könnte das Wachstum der Algen und heterotrophen Bakterien im Biofilm steigern (Asaduzzaman et al., 2008). Eine kontinuierliche Zugabe von Spuren von PES als exogene reaktive Sauerstoffspezien (reactive oxygen species, ROS), könnte trotzdem ausreichen um oxidativen Stress zu induzieren. Bakterien haben, insbesondere in der Wachstumsphase, eine geringe Toleranz gegenüber oxidativem Stress (Sigler et al., 1999). Für ein Überleben unter oxidative

Stressbedingungen müssen sie daher die Synthese von antioxidativen Enzymen steigern, welches Energie verbraucht und daher die Reproduktion inhibiert. Im Gegensatz dazu, unterlaufen Algen photoprotektive Prozesse die sie vor oxidativen Schäden schützen und daher ihre Toleranz gegenüber oxidativem Stress erhöhen (Niyogi, 1999). Der kombinierte Effekt von Kohlenstoff- und ROS-Zufuhr hat bei der kontinuierlichen Behandlung mit PES das Algenwachstum gefördert und gleichzeitig das Wachstum der Bakterien im Biofilm inhibiert. Die Algen nehmen bei ihrer Photosynthese CO_2 auf und geben O_2 ab wohingegen Bakterien durch aerobe Respiration O_2 verbrauchen und CO_2 produzieren. Gesteigertes Algenwachstum und inhibiertes Bakterienwachstum resultiert daher in höherem O_2 – und niedrigerem CO_2 – Gehalt. Da CO_2 in Wasser Kohlensäure bildet und den pH senkt, führt ein geringerer CO_2 – Gehalt zu einem Anstieg des pH. Dies wurde auch in der vorliegenden Studie beobachtet.

Wie zuvor diskutiert, reduzierte die kontinuierliche Behandlung von PES das bakterielle Wachstum. Das Wachstum von nitrifizierenden Bakterien und der Nitrifikationsprozess sind daher vermutlich ebenfalls inhibiert. Die kontinuierliche Behandlung mit PES führte jedoch zu gleichen Konzentrationen an Ammonium, Nitrat und Nitrit wie in der Kontrollgruppe. Die inhibierte Nitrifikation wurde einerseits durch den Wasseraustausch des Durchflusssystems gepuffert. Dies zeigte sich durch die gleichen täglichen Änderungen der Stickstoffkomponenten in allen gemessenen Gruppen, die jeweils 12 h vor Fütterung gemessen wurden. Die inhibierte Nitrifikation wurde durch das Algenwachstum kompensiert, da Algen Ammonium, Nitrit und Nitrat assimilieren und in Proteine oder Nukleinsäuren umwandeln (Inokuchi et al., 2002; Mallick, 2002).

4.5 Peressigsäure fördert die Gesundheit der Fischkiemen in RAS

Im Test 1 wiesen Karpfen, die zwei Mal wöchentlich mit 1 mg/l PES behandelt wurden, geringere histopathologische Veränderungen der Kiemen als die Kontrollgruppe auf. Die behandelten Tiere hatten weniger Hyperplasien und Anhebungen der Kiemenfilamente als die unbehandelten Tiere. Besonders in der Kontrollgruppe war eine große Anzahl eosinophiler Granulozyten zu finden, wohingegen in den PES-behandelten Fischen nur

wenige auftraten. Dies ist vermutlich auf suboptimale Wasserbedingungen zurückzuführen. Dies wurde, wie zuvor diskutiert auch durch die Messung der im Wasser zu findenden Bakterien belegt. Während der PES-Behandlung wurde der Wasserdurchfluss angehalten. In den unbehandelten Becken waren die Fische dabei einer einer höheren Anzahl von Bakterien konfrontiert als in Becken, in welchen PES appliziert wurde. Auch wenn der Wasserfluss während der restlichen Zeit aufrechterhalten wurden und die Bakteriendichte daher im gesamten RAS gleichmäßig war, hat die kurzzeitige Anwendung mit PES geholfen, die Wasserqualität und nachfolgend die Gesundheit der Kiemen zu steigern.

4.6 Anwendungsstrategie von Peressigsäure in RAS

PES in Konzentration bis zu 2 mg/l stellte einen adaptierbaren und minimalen Stress für Fische dar. Die PES-Exposition hatte keinen Einfluss auf Wachstum oder die angeborenen zelluläre Immunität. Sie hat die Gesundheit der Kiemen bei suboptimalen Wasserbedingungen sogar gefördert. Wir empfehlen daher, dass PES direkt in die Aufzuchteinheiten appliziert wird. Es ist anzumerken, dass Mischmaßnahmen, wie Belüftung, simultan erfolgen sollten, um eine bestmögliche Verteilung zu gewährleisten. Gleichzeitig hat PES einen generellen antibakteriellen Effekt. Bei Konzentrationen höher als 1 mg/l inhibiert PES die Nitrifikationsprozesse. Bei geringen Konzentrationen blieb der Nitrifikationsprozess unbeeinflusst. Damit nitrifizierende Bakterien geschützt werden, sollte darauf vermieden werden, hohe Konzentrationen an PES direkt auf die Biofilter zu applizieren. Nach dem oben aufgestellten Verteilungsmodell wird PES, welches der Aufzuchteinheit zugegeben wird, zunächst im mechanischen Filter verdünnt bevor es in den Biofilter gelangt. Die Verdünnungsgeschwindigkeit ist dabei hauptsächlich von der Durchflussrate und dem Wasservolumen jeder Einheit abhängig. Wenn man die spontane Degradation von PES in die Betrachtung einbezieht, ist die Konzentration, die den Biofilter erreicht, deutlich geringer als die applizierte Dosis. Zur Verringerung der PES-Konzentration welche den Biofilter erreichen, kann der Wasserdurchfluss temporär verringert werden.

Wir empfehlen die Strategie der wiederholten Pulsbehandlungen mit höheren

Konzentrationen (1-2 mg/l PES) gegenüber der kontinuierlichen Tropfen-Applikation. Grund dafür ist, dass die erstgenannte den Biofilm in der Aufzuchteinheit reduzieren kann, wohingegen die letztgenannte die Bildung des Biofilms fördert. Dies ist gefährlich, da der Biofilm als Reservoir für opportunistische Fischpathogene wirken kann.

5 Zusammenfassung und Perspektive

In der vorliegenden Studie konnten wir belegen, dass PES in Konzentration bis zu 2 mg/l ein adaptiver und minimaler Stressor für Fische ist. Wachstum und angeborene zelluläre Immunität wurden durch die Anwendung nicht beeinflusst. Bei ungünstigen Wasserbedingungen wirkte PES sogar förderlich auf die Gesundheit der Kiemen. In hohen PES Konzentrationen (1-2 mg/l) wurde die Anzahl an Bakterien, inclusive Nitrifizierer, verringert. Auch wenn geringe Konzentrationen an PES für Bakterien nicht letal wirkt, könnte es oxidativen Stress induzieren und daher ihren Metabolismus und Reproduktion behindern. Damit eine gute Hygiene in RAS gewährleistet und potenzielle Krankheiten verhindert werden können, empfehlen wir, PES in Konzentrationen von 1-2 mg/l wöchentlich direkt in die Aufzuchteinheit zu applizieren. Eine gleichzeitige Reduktion des Wasserdurchflusses bzw. das Zugeben von Wasser zum mechanischen Filter verringert vermutlich adverse Effekte auf den Biofilter.

Eukaryotische Algen können Stickstoffkomponenten und CO₂ absorbieren. Im Gegenzug bilden sie Algenbiomasse und setzen O₂ frei. Theoretisch erfüllen sie damit die Funktion eines Biofilters. Weiterhin scheinen sie selbst bei Konzentrationen bis zu 2 mg/l extrem tolerant gegenüber PES zu sein. Basierend auf diesen Ergebnissen wäre es möglich, ein Biofilter-freies RAS zu entwickeln, welches Aquakultur und Algenproduktion kombiniert. PES kann regelmäßig auf das gesamte System appliziert werden und daher ein geringes Risiko für pathogene Krankheiten aufrechterhalten werden.

Produkte auf PES-Basis sind geeignet fischpathogene Keime in Aquakulturanlagen zu reduzieren und die Gesundheit der Fische ohne den Einsatz von Antibiotika oder Medikamenten zu verbessern! Beim Einsatz von PES sind keine Rückstände im Produkt oder

in der Umwelt zu erwarten. PES sollte regelmäßig prophylaktisch appliziert werden um von vornherein die Bildung hoher Keimdrücke und somit Fischkrankheiten und Fischverluste zu vermeiden. Eine PES-Applikation bei akutem Krankheitsgeschehen mit Verlusten ist kontraproduktiv.

Für die praktische Anwendung von PES in Aquakulturanlagen sind folgende Empfehlungen abzugeben: PES sollte nur im Haltungsteil der Anlagen in Konzentrationen von 1-2 mg/l appliziert werden. Die benötigte Menge an PES muss anhand des Volumens des Haltungsteil kalkuliert werden. Auf eine gleichmäßige Verteilung des Wirkstoffs im Haltungswasser mittels Umwälzpumpen oder Belüftung ist zu achten. Für Aquakultureinrichtungen mit hohem Haltungsvolumen ist die Desinfektion über den gesamten Haltungsbereich statt an einer Stelle vorzuziehen. Die PES-Desinfektion sollte mindestens einmal wöchentlich erfolgen. Der PES-Zerfall und somit auch die Wirksamkeit sind von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Entscheidend sind, neben biologischen Parametern wie Tierart und –alter, die chemo-physikalischen Wasserparameter wie der DOC, die Wasserhärte, der Salzgehalt und die Temperatur. In Abhängigkeit von diesen Parametern variiert der PES-Zerfall zwischen ca. 15 min in trübem, belastetem bis ca. 5 h in reinem, unbelastetem Wasser. In Aquakulturanlagen mit hoher Besatzdichte und trübem Wasser ist ein sehr schneller Zerfall von PES zu erwarten. In solchen Anlagen sollte eine häufigere PES-Desinfektion erfolgen. Es empfiehlt sich die Desinfektion in RAS mit niedrigen Konzentrationen zu beginnen und dann, falls notwendig, schrittweise zu steigern. Die Nitrifikationsleistung der Biofilter ist während und nach der Desinfektion zu messen. Falls keine Effekte auf die Nitrifikanten zu beobachten sind kann die PES-Konzentration schrittweise gesteigert werden.

6 Danksagungen

Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung durch die DBU. Wir bedanken uns für unsere Kooperationspartner, Lars-Flemming Pedersen und David L. Straus, für die Zusammenarbeit auf diesen Projekt und die Mitautorenschaft in wissenschaftlichen

Publikationen. Weiterhin bedanken wir uns für die technische Unterstützung durch Sascha Behrens, Torsten Preuer, Viola Vielmann, Angela Krüger vom IGB-Berlin und Ulla Sproegel, Brian Møller, Sara Møller Nielsen, Ole Madvig Larsen, Rasmus Frydenlund Jensen von der DTU-Aqua. Wir bedanken uns auch für die freundliche Hilfe von Thora Lieke, Liwen Wu, Cristobal Cobo, Jenny Vivas Munoz, Nora Baberschke und Christin Höhne vom IGB-Berlin.

7. Literatur

Alvaro, J. E., Moreno, S., Dianez, F., Santos, M., Carrasco, G., Urrestarazu, M., 2009. Effects of peracetic acid disinfectant on the postharvest of some fresh vegetables. *Journal of Food Engineering* 95, 11-15.

Asaduzzaman, M., Wahab, M. A., Verdegem, M. C. J., Huque, S., Salam, M. A., Azim, M. E., 2008. C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. *Aquaculture* 280, 117-123.

Brüning, Anika, Hölker, Franz, Franke, Steffen, Preuer, Torsten, Kloas, Werner, 2015. Spotlight on fish: Light pollution affects circadian rhythms of European perch but does not cause stress. *Science of The Total Environment* 511, 516-522.

Crebelli, R., Conti, L., Monarca, S., Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C., Veschetti, E., Cutilli, D., Ottaviani, M., 2005. Genotoxicity of the disinfection by-products resulting from peracetic acid- or hypochlorite-disinfected sewage wastewater. *Water Res* 39, 1105-1113.

de Lafontaine, Y., Despatie, S. P., Veilleux, E., Wiley, C., 2009. Onboard ship evaluation of the effectiveness and the potential environmental effects of PERACLEAN Ocean for ballast water treatment in very cold conditions. *Environ Toxicol* 24, 49-65.

Ellis, T., James, J. D., Stewart, C., Scott, A. P., 2004. A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 65, 1233-1252.

Ellis, T., James, J. D., Sundh, H., Fridell, F., Sundell, K., Scott, A. P., 2007. Non-invasive measurement of cortisol and melatonin in tanks stocked with seawater Atlantic salmon.

Aquaculture 272, 698-706.

Fanouraki, E., Papandroulakis, N., Ellis, T., Mylonas, C.C., Scott, A.P., Pavlidis, M., 2008. Water cortisol is a reliable indicator of stress in European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Behaviour 145, 1267-1281.

Goos, H. J. Th, Consten, D., 2002. Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. Molecular and Cellular Endocrinology 197, 105-116.

Gregory, T. Ryan, Wood, Chris M., 1999. The Effects of Chronic Plasma Cortisol Elevation on the Feeding Behaviour, Growth, Competitive Ability, and Swimming Performance of Juvenile Rainbow Trout. Physiological and Biochemical Zoology 72, 286-295.

Inokuchi, Ritsuko, Kuma, Kei-ichi, Miyata, Takashi, Okada, Mitsumasa, 2002.

Nitrogen-assimilating enzymes in land plants and algae: phylogenic and physiological perspectives. Physiologia Plantarum 116, 1-11.

Jeffrey, J. D., Gollock, M. J., Gilmour, K. M., 2014. Social stress modulates the cortisol response to an acute stressor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). General and Comparative Endocrinology 196, 8-16.

Jussila, J., Makkonen, J., Kokko, H., 2011. Peracetic acid (PAA) treatment is an effective disinfectant against crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) spores in aquaculture. Aquaculture 320, 37-42.

Kitis, M., 2004. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. Environ Int 30, 47-55.

Liu, Dibo, Steinberg, Christian E. W., Straus, David L., Pedersen, Lars-Flemming, Meinelt, Thomas, 2014. Salinity, dissolved organic carbon and water hardness affect peracetic acid (PAA) degradation in aqueous solutions. Aquacultural Engineering 60, 35-40.

Liu, Dibo, Straus, David L., Pedersen, Lars-Flemming, Meinelt, Thomas, 2015. Comparison of the Toxicity of Wofasteril Peracetic Acid Formulations E400, E250, and Lspez to *Daphnia magna*, with Emphasis on the Effect of Hydrogen Peroxide. North American Journal of Aquaculture 77, 128-135.

López-Olmeda, J. F., López-García, I., Sánchez-Muros, M. J., Blanco-Vives, B., Aparicio, R.,

Sánchez-Vázquez, F. J., 2012. Daily rhythms of digestive physiology, metabolism and behaviour in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture International* 20, 1085-1096.

Loukili, N. H., Granbastien, B., Faure, K., Guery, B., Beaucaire, G., 2006. Effect of different stabilized preparations of peracetic acid on biofilm. *The Journal of hospital infection* 63, 70-72.

Mallick, Nirupama, 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *Biometals* 15, 377-390.

Marchand, P. A., Phan, T. M., Straus, D. L., Farmer, B. D., Stuber, A., Meinelt, T., 2012. Reduction of *in vitro* growth in *Flavobacterium columnare* and *Saprolegnia parasitica* by products containing peracetic acid. *Aquaculture Research* 43, 1861-1866.

Meinelt, T., Matzke, S., Stuber, A., Pietrock, M., Wienke, A., Mitchell, A. J., Straus, D. L., 2009. Toxicity of peracetic acid (PAA) to tocomonts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 86, 51-56.

Meinelt, T., Phan, T. M., Behrens, S., Wienke, A., Pedersen, L. F., Liu, D., Straus, D. L., 2015. Growth inhibition of *Aeromonas salmonicida* and *Yersinia ruckeri* by disinfectants containing peracetic acid. *Diseases of Aquatic Organisms* 113, 207-213.

Montoya, A., López-Olmeda, J. F., Garayzar, A. B. S., Sánchez-Vázquez, F. J., 2010. Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) under a light–dark cycle. *Physiology & Behavior* 101, 101-107.

Mota, Vasco C., Martins, Catarina I. M., Eding, Ep H., Canário, Adelino V. M., Verreth, Johan A. J., 2014. Steroids accumulate in the rearing water of commercial recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 62, 9-16.

Niyogi, Krishna K., 1999. PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 333-359.

Oliveira, Catarina C V., Aparício, Rocio, Blanco-Vives, Borja, Chereguini, Olvido, Martín, Ignacio, Javier Sánchez-Vázquez, F., 2013. Endocrine (plasma cortisol and glucose) and behavioral (locomotor and self-feeding activity) circadian rhythms in Senegalese sole (*Solea*

senegalensis Kaup 1858) exposed to light/dark cycles or constant light. *Fish Physiol Biochem* 39, 479-487.

Øverli, Ø, Harris, C. A., Winberg, S., 1999. Short-Term Effects of Fights for Social Dominance and the Establishment of Dominant-Subordinate Relationships on Brain Monoamines and Cortisol in Rainbow Trout. *Brain, Behavior and Evolution* 54, 263-275.

Pedersen, L. F., Pedersen, P. B., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., 2009. Peracetic acid degradation and effects on nitrification in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 296, 246-254.

Pedersen, L. F., Meinelt, T., Straus, D. L., 2013. Peracetic acid degradation in freshwater aquaculture systems and possible practical implications. *Aquacultural Engineering* 53, 65-71.

Pedersen, Lars-Flemming, Pedersen, Per B., 2012. Hydrogen peroxide application to a commercial recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering* 46, 40-46.

Picon-Camacho, S. M., Marcos-Lopez, M., Beljean, A., Debeaume, S., Shinn, A. P., 2012. *In vitro* assessment of the chemotherapeutic action of a specific hydrogen peroxide, peracetic, acetic, and peroctanoic acid-based formulation against the free-living stages of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora). *Parasitol Res* 110, 1029-1032.

Quick, Robert, Harrison, Eliot, 2010. Revised Environmental Assessment For Peroxyacetic Acid/Hydrogen Peroxide Formulation Food-Contact Notification (FCN) U.S. Food and Drug Administration.

Rao, T. S., 2010. Comparative effect of temperature on biofilm formation in natural and modified marine environment. *Aquatic Ecology* 44, 463-478.

Reiser, S., Schroeder, J. P., Wuertz, S., Kloas, W., Hanel, R., 2010. Histological and physiological alterations in juvenile turbot (*Psetta maxima*, L.) exposed to sublethal concentrations of ozone-produced oxidants in ozonated seawater. *Aquaculture* 307, 157-164.

Ruane, Neil M., Komen, Hans, 2003. Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increased loading density in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 218, 685-693.

Scott, Alexander P., Ellis, Tim, 2007. Measurement of fish steroids in water—a review. *General and Comparative Endocrinology* 153, 392-400.

Sebire, Marion, Katsiadaki, Ioanna, Scott, Alexander P., 2007. Non-invasive measurement of 11-ketotestosterone, cortisol and androstenedione in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *General and Comparative Endocrinology* 152, 30-38.

Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanová, J., Stadler, N., Höfer, M., 1999. Oxidative stress in microorganisms—I. *Folia Microbiologica* 44, 587-624.

Slovan, Katherine A., Metcalfe, Neil B., Taylor, Alan C., Gilmour, Kathleen M., 2001. Plasma Cortisol Concentrations Before and After Social Stress in Rainbow Trout and Brown Trout. *Physiological and Biochemical Zoology* 74, 383-389.

Straus, D. L., Meinelt, T., 2009. Acute toxicity of peracetic acid (PAA) formulations to *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. *Parasitol Res* 104, 1237-1241.

Straus, D. L., Meinelt, T., Farmer, B. D., Mitchell, A. J., 2012. Peracetic acid is effective for controlling fungus on channel catfish eggs. *Journal of Fish Diseases* 35, 505-511.

Sudová, E., Straus, D. L., Wienke, A., Meinelt, T., 2010. Evaluation of continuous 4-day exposure to peracetic acid as a treatment for *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology Research* 106, 539-542.

Tort, Lluís, 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 35, 1366-1375.

van Dam, Anne A., Beveridge, Malcolm C. M., Azim, M. Ekram, Verdegem, Marc C. J., 2002. The potential of fish production based on periphyton. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12, 1-31.

Vermeirssen, Étienne L. M., Scott, Alexander P., 1996. Excretion of Free and Conjugated Steroids in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evidence for Branchial Excretion of the Maturation-Inducing Steroid, 17,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one. *General and Comparative Endocrinology* 101, 180-194.

Wagner, M., Brumelis, D., Gehr, R., 2002. Disinfection of wastewater by hydrogen peroxide or peracetic acid: development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent. *Water environment research : a research publication of the Water Environment Federation* 74, 33-50.

Wong, Stephanie, Earley, Ryan, Campbell, Janet, Dykstra, Mark, 2008. Measuring water-borne cortisol in convict cichlids (*Amatitlania nigrofasciata*): is the procedure a stressor? Behaviour 145, 1283-1305.

Yuan, Z., Ni, Y., Van Heiningen, A. R. P., 1997a. Kinetics of peracetic acid decomposition: Part I: Spontaneous decomposition at typical pulp bleaching conditions. The Canadian Journal of Chemical Engineering 75, 37-41.

Yuan, Z., Ni, Y., Van Heiningen, A. R. P., 1997b. Kinetics of the peracetic acid decomposition part II: pH effect and alkaline hydrolysis. Canadian Journal of Chemical Engineering 75, 42-47.