

Projekt: AZ 30996
Zeitraum: 2013-2016
Projektleitung: Dr. Alexander Brinker
Projekt-Bearbeitung: Cornelius Becke



Deutsche
Bundesstiftung Umwelt

www.dbu.de



Direkte und indirekte Effekte der Schwebstoffbelastung in Kreislaufanlagen auf die Gesundheit und die Wachstumsleistung von Salmoniden

Kurztitel: Fischgesundheit und Schwebstoffbelastung in Kreislaufanlagen

Alexander Brinker, Cornelius Becke, Mark Schumann



LANDWIRTSCHAFTLICHES ZENTRUM BADEN-WÜRTTEMBERG
RINDERHALTUNG • GRÜNLANDWIRTSCHAFT • MILCHWIRTSCHAFT • WILD • FISCHEREI



FISCHEREIFORSCHUNGSSTELLE
BADEN-WÜRTTEMBERG

**Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt**



Az	30996	Referat	Fördersumme	236.506,00 €
Antragstitel		Direkte und indirekte Effekte der Schwebstoffbelastung in Kreislaufanlagen auf die Gesundheit und die Wachstumsleistung von Salmoniden		
Stichworte		Schwebstoffbelastung, Kreislaufanlage, Fischgesundheit, Aquakultur		
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)	
3,5 Jahre	01.07.2013	31.12.2016		
Zwischenberichte				
Bewilligungsempfänger			Tel 07543/9308324 Fax 07543/9308320	
Landwirtschaftliches Zentrum für Rinderhaltung, Grünlandwirtschaft, Milchwirtschaft, Wild und Fischerei Baden-Württemberg (LAZBW) Fischereiforschungsstelle Baden-Württemberg Argenweg 50/1 88085 Langenargen			Projektleitung Dr. Alexander Brinker	
			Bearbeiter Cornelius Becke	
Kooperationspartner				
Zielsetzung und Anlass des Vorhabens				
<p>Offene Durchflusssysteme sind die dominierende Fischproduktionsform in Deutschland, jedoch kann das Ablaufwasser dieser Anlagen für umliegende Ökosysteme problematisch sein. Aufgrund dessen gibt es immer strengere Umweltauflagen und die Vergabe neuer Wasserrechte wird stark eingeschränkt. Als Folge stagniert die Fischproduktion und die Nachfrage an Fisch kann in Deutschland schon nicht mehr annähernd gedeckt werden. Kreislaufanlagen gelten als umweltfreundliche Alternative zu den offenen Durchflusssystemen, jedoch sind sie bisher wirtschaftlich nicht konkurrenzfähig. Eine Möglichkeit die Wirtschaftlichkeit dieser Anlagen zu verbessern wäre die Intensivierung der Produktion. Durch die Intensivierung der Fischproduktion wird es aber zwangsläufig auch zu einer stärkeren Partikelbelastung kommen. Große Partikel werden zwar durch die mechanische Filtration entfernt, jedoch können sich kleine Partikel mit der Zeit anreichern. Diesen Partikeln wird eine hohe Schädigung auf die Fischgesundheit zugeschrieben, jedoch wurden die Auswirkungen von Schwebstoffbelastung in Kreislaufanlagen bisher nicht ausreichend untersucht. Daher war das Ziel dieses Projektes, den Einfluss sich akkumulierender Kleinstpartikel in Kreislaufanlagen auf die Fischgesundheit und die Systemstabilität zu ergründen.</p>				
Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden				
<p>Um die Auswirkung von Feinstpartikeln in Kreislaufanlagen auf die Gesundheit und die Wachstumsleistung von Salmoniden zu erfassen, wurden bei unterschiedlichen Experimenten verschiedene Stressparameter untersucht. Zum einen erfolgte eine umfassende Untersuchung verschiedenster Blutparameter (u.a. Zellzahlen, Hämatokrit, Hämoglobin, Differentialblutbild) und zum anderen wurden klassische Stressparameter wie Hitzeschockprotein 70 und Plasmacortisol mittels ELISA überprüft. Des Weiteren wurden die Kiemen der Regenbogenforellen histologisch auf mögliche Schäden durch Feinstpartikel untersucht und der Zustand der Flossen anhand von Flossenindex und Grad der Flossenerosion ermittelt. Die Leistungsparameter der Fische wurden anhand von Futterquotient, spezifischer Wachstumsrate, Überlebensrate, thermaler Wachstumskoeffizient und Endgewicht ermittelt. Auch die Auswirkung der Schwebstoffbelastung auf die bakterielle Belastung wurde untersucht.</p>				
Hinsichtlich der Partikel wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:				
<ul style="list-style-type: none"> - Messung der Partikelgrößenverteilung mittels Laser - Formanalyse der Partikel mittels Imaging Particle Analysis - Erfassung der Schwebstoffkonzentration durch Druckfiltration 				
<small>Deutsche Bundesstiftung Umwelt • An der Bornau 2 • 49090 Osnabrück • Tel 0541/9633-0 • Fax 0541/9633-190 • http://www.dbu.de</small>				

Ergebnisse und Diskussion

Es stellte sich heraus, dass allein durch die Verwendung unterschiedlicher Futtermittel keine ausreichende Partikelbelastung in den Kreislaufanlagen hervorgerufen werden konnte. Nach der erfolgreichen Etablierung der Methode zur Partikelanreicherung wurde ein Kurzzeitversuch (4 Wochen) durchgeführt. Dabei konnte bei allen untersuchten Parametern keine negativen Auswirkungen festgestellt werden. Entgegen der Erwartung war der Zustand der Kiemen und Flossen bei Fischen aus dem Kreislauf mit erhöhter Partikelbelastung z.T. sogar besser als bei Fischen aus dem Kontrollkreislauf.

Auch im Langzeitversuch über 18 Wochen konnten keine negativen Auswirkungen festgestellt werden. Zwar zeigte die Untersuchung der bakteriellen Belastung höhere Werte im Kreislauf mit erhöhter Partikelbelastung, jedoch war diese im Normalbereich von Kreislaufanlagen. Auch waren bei den untersuchten Gesundheitsparametern keinerlei erhöhte Werte festzustellen. Bei der histologischen Untersuchung der Kiemenstrukturen zeigte sich, dass die Anzahl an Schleimzellen pro Sekundärlamelle bei Fischen im Belastungskreislauf im Vergleich zum Kontrollkreislauf erhöht war. Dies ist vermutlich als Adaption auf die erhöhte Partikelbelastung zu sehen.

Auch die zusätzliche Belastung durch erhöhte NH_3 -Konzentration bewirkte keine negativen Auswirkungen der Schwebstoffbelastung auf die Regenbogenforellen.

Die Formanalyse der Partikel hat gezeigt, dass es sich bei den Partikeln hauptsächlich um flockenförmige Partikel handelt, die aus dem Kot der Fische entstehen. Aufgrund des organischen Ursprungs sind diese Partikel somit nicht vergleichbar mit mineralischen Partikeln in Durchflussanlagen z.B. nach Starkregenereignissen. Dadurch ist vermutlich auch die geringe Schädigung der Partikel in Kreislaufanlagen auf die Regenbogenforellen zu erklären.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Die Ergebnisse dieses Projektes wurden bei verschiedenen nationalen und internationalen Fachtagungen präsentiert (s. Ende des Abschlussberichts). Auch wurden die Ergebnisse bei einer Fortbildungstagung für Forellenzüchter in Baden-Württemberg vorgestellt.

Fazit

Insgesamt zeigt sich, dass die bisherige Einschätzung dass die Schwebstoffbelastung in Kreislaufanlagen ein wichtiger Aspekt der Fischgesundheit und Leistungsfähigkeit ist, grundlegend revidiert werden muss. Selbst langfristige Belastungen, die in Fischzuchten nur ausnahmsweise dokumentiert werden, zeigen keine Beeinträchtigung der Fische. Es zeigt sich zum einen, wie wichtig eine wissenschaftliche Überprüfung vermeintlicher Gewissheit sein kann, und zum anderen, wie wichtig eine saubere Entkopplung des zu untersuchenden Faktors von Begleiteffekten ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
3	Material und Methoden	6
3.1	Aufbau Versuchsanlage.....	6
3.2	Wasseranalytik.....	7
3.3	Partikel-Analyse	8
3.4	Leistungsparameter der Fische	9
3.5	Gesundheitsparameter	9
3.6	Bakterielle Belastung	14
4	Experiment 1: Fütterungsversuch mit konventionellen Futtermitteln	17
4.1	Versuchsdurchführung.....	17
4.2	Ergebnisse	19
4.3	Diskussion	27
5	Etablierung der Partikelanreicherung.....	29
6	Experiment 2: Kurzzeit-Exposition bei einer Partikelkonzentration von über 25 mg/L.....	31
6.1	Versuchsdurchführung.....	31
6.2	Ergebnisse	32
	Flossenzustand.....	37
	Hitzeschockprotein 70 und Plasmacortisol	38
	Hämatologie.....	39
6.3	Diskussion	40
7	Experiment 3: Langzeit-Exposition bei einer Partikelkonzentration von über 30 mg/L	42
7.1	Versuchsdurchführung.....	42
7.2	Ergebnisse	44
7.3	Diskussion	55
8	Experiment 4: Formanalyse der suspendierten Feststoffe	59
8.1	Versuchsdurchführung.....	59
8.2	Ergebnisse	61
8.3	Diskussion	70
9	Experiment 5: Langzeitexposition bei einer Partikelbelastung von über 35 mg/L und zusätzlich erhöhter NH ₃ -Konzentration	72
9.1	Versuchsdurchführung.....	72
9.2	Ergebnisse	74
9.3	Diskussion	90
10	Fazit.....	93
11	Veröffentlichung/Verbreitung	95
12	Literatur	98

1 Zusammenfassung

Kreislaufanlagen gelten in der Aquakultur als umweltfreundliche Alternative zu offenen Durchflusssystemen. Sie sind jedoch bisher in der Regel wirtschaftlich noch nicht konkurrenzfähig, so dass es einer Optimierung der Anlagen bedarf. Eine Möglichkeit die Wirtschaftlichkeit von Kreislaufanlagen zu erhöhen wäre die Intensivierung der Fischproduktion. Dies bedeutet aber auch zwangsläufig eine höhere Schwebstoffbelastung in den Anlagen. Zwar werden größere Partikel durch mechanische Filtration effektiv aus dem System entnommen, jedoch verbleiben kleine Partikel in der Anlage und können sich entsprechend mit der Zeit anreichern. Diesen Feinstpartikeln wird in der Literatur eine hohe Schadwirkung zugesprochen, jedoch ist die tatsächliche Auswirkung auf die Fischgesundheit bisher nicht ausreichend untersucht. Ziel dieses Projekts war es daher, die Auswirkungen von erhöhten Schwebstoff-Konzentrationen auf die Fischgesundheit zu untersuchen, denn das Wohlbefinden der Fische und damit ihre physiologische Unversehrtheit ist ein entscheidender Faktor bei der Fischerzeugung. Nur wenn diese gegeben ist, können Futter- und Wasserressourcen optimal zur Fischerzeugung genutzt werden und die Fische tiergerecht erzeugt werden.

Vor diesem Hintergrund wurden in diesem Projekt drei aufeinander aufbauende Experimente mit Regenbogenforellen durchgeführt. Die Versuchsanlage bestand aus zwei replizierten Kreislaufanlagen, von denen eine Kreislaufanlage als Kontrolle unter Normalbedingungen betrieben wurde und in der anderen Kreislaufanlage die Partikelbelastung artifiziell erhöht wurde. Des Weiteren wurde die Schwebstoffbelastung von potentiell störenden Wasserparametern entkoppelt und zwischen den Versuchskreisläufen vergleichbar gehalten, um die alleinige Auswirkung der Partikel auf die Fischgesundheit analysieren zu können.

Im ersten Versuch wurde die Auswirkung von erhöhter Partikelbelastung (25 mg/L) über einen vergleichsweise kurzen Zeitraum von 4 Wochen untersucht. Dabei wurden für relevante Gesundheitsparameter keine negativen Auswirkungen auf die Physiologie der Regenbogenforellen festgestellt. Erstaunlich war, dass hinsichtlich der Kiemenstrukturen und Flossen die Fische aus dem Belastungskreislauf sogar z.T. einen besseren Zustand aufwiesen als die Fische aus dem Kontrollkreislauf. Im darauf folgenden Langzeitversuch wurde die

Auswirkung von erhöhtem Partikelauflkommen (30 mg/L) über einen längeren Zeitraum (18 Wochen) untersucht, um auch mögliche chronische Effekte zu erfassen. Jedoch wurde auch hier, wie schon beim Kurzzeitversuch, keine negative Auswirkung festgestellt. Einzig die bakterielle Belastung war im Belastungskreislauf leicht erhöht. Auch eine nochmalige drastische Erhöhung der Partikelkonzentration auf bis zu 70 mg/L im dritten Versuch, diesmal bei gleichzeitig zugelassener Erhöhung der NH_3 -Konzentration, wirkte sich nicht negativ auf die Fischgesundheit aus.

Die im Zuge dieses Projekts zusätzlich durchgeführte Analyse der Partikelform hat gezeigt, dass es sich bei den Schwebstoffen in den Kreislaufanlagen hauptsächlich um flockenförmige Partikel handelt und nur in geringfügigen Mengen faserförmige Partikel vorkommen. Da die Schwebstoffe in Kreislaufanlagen hauptsächlich aus dem Kot der Fische entstehen und somit organischen Ursprungs sind, ist zumindest die mechanische Schädigung dieser Partikel vermutlich nicht so groß wie z.B. bei Starkregenereignissen in Durchflussanlagen oder im Freiland, wo die zum größten Teil mineralischen Schwebstoffe eine deutlich höhere Dichte haben und scharfkantig sein können.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieses Projekts, dass die alleinigen Partikelbelastungen die in Kreislaufanlagen erreicht werden keine gravierenden Auswirkungen auf die Fischgesundheit bedingen und somit die bisherigen Literatur-Grenzwerte nicht bestätigt werden können, sondern sogar als „Fehlalarm“ zu interpretieren sind.

2 Einleitung

Aufgrund von weltweit stark rückläufigen Fischbeständen gewinnt die Aquakultur für die Fischerzeugung einen immer höheren Stellenwert. Während die Fangzahlen des kommerziellen Fischfangs seit mehreren Jahren stagnieren, wächst der Anteil der Aquakultur an der Fischproduktion stetig und betrug 2014 schon über 44 % (FAO, 2016). Doch innerhalb der EU und vor allem auch in der Bundesrepublik Deutschland stagnieren die Produktionszahlen (Brämick, 2016). Ein Grund dafür sind die immer strengeren Auflagen für offene Durchflusssysteme, die dominierende Produktionsform in Deutschland. Das Ablaufwassers dieser Anlagen kann punktuell für angrenzende Ökosysteme problematisch sein. Dies führt zu strengeren Umweltauflagen für die Betreiber solcher Anlagen und zu Einschränkungen bei der Vergabe neuer Wasserrechte. Dadurch kann die Nachfrage an Fisch in Deutschland nicht mehr annähernd gedeckt werden, so dass inzwischen 84 % aller Süßwasserfische nach Deutschland importiert werden (Brämick, 2016).

Kreislaufanlagen sind geschlossene Systeme und werden daher hinsichtlich des Wasserverbrauchs und der Belastung angrenzender Ökosystem häufig als umweltfreundliche Alternative zu Durchflussanlagen gesehen (Ayer und Tyedmers, 2009; Klinger und Naylor, 2012). Ein weiterer Vorteil von Kreislaufanlagen ist, dass sie unabhängig von Wasservorkommen sind und somit direkt am Absatzmarkt gebaut werden können. Jedoch sind Kreislaufanlagen im Vergleich zu offenen Durchflusssystemen aufgrund hoher Investitions- und Betriebskosten in der Regel ökonomisch noch nicht konkurrenzfähig. Eine Möglichkeit die Kosten pro produzierter Einheit zu drücken, wäre eine Intensivierung der Produktion (Martins et al., 2005), u.a. durch höhere Besatzdichten. Mit einer steigenden Intensität der Produktion steigen jedoch auch die Risiken (z.B. schlechtere Wasserqualität, geringere Systemstabilität), so dass insgesamt eine Optimierung dieser Anlagen nötig ist.

Als ein Kardinalproblem für die meisten Anlagenstörungen von Kreislaufanlagen wird die Schwebstoffbelastung gesehen (Badiola et al., 2012). Durch die Intensivierung der Fischproduktion kommt es zwangsläufig auch zu einer stärkeren Partikelbelastung, da höhere Fischdichten in der Regel auch gleichzeitig eine höhere Abgabe von Fischkot ins Wasser bedeuten. Zwar werden große Partikel durch mechanische Reinigung (z.B. durch die Verwendung von Trommelfiltern) effektiv aus dem System entnommen, jedoch verbleiben Partikel, die kleiner als die verwendete Filtergaze sind, im System. Dadurch kann es mit der

Zeit zu einer Anreicherung von Feinstpartikeln kommen. Gerade diesen Feinstpartikeln wird eine hohe Schadwirkung bezüglich der Fischgesundheit zugesprochen (Chapman et al., 1987; Chen und Malone, 1991). Es konnte gezeigt werden, dass Schwebstoffe in Oberflächengewässern verantwortlich für Verletzungen der Kiemenstrukturen (Au et al., 2004; Bash et al., 2001; Bilotta und Brazier, 2008; Bruton, 1985; Chapman et al., 1987; Humborstad et al., 2006; Wong et al., 2013), Veränderung des Verhaltens (Robertson et al., 2007) und erhöhtem Stress (Awata et al., 2011; Lake und Hinch, 1999; Sutherland et al., 2008) bei Fischen sein können. In Kreislaufanlagen entstehen die Schwebstoffe jedoch hauptsächlich aus dem Kot der Fische, so dass diese Partikel in Kreislaufanlagen nicht mit Partikeln in Oberflächengewässern, z.B. nach Starkregenereignissen, verglichen werden können. In der Literatur wird für die Fischzucht häufig ein Grenzwert von 25 mg/L für die Partikelbelastung genannt (Alabaster und Lloyd, 1982; Timmons und Ebeling, 2010), jedoch sind die Auswirkungen von erhöhter Partikelkonzentration in Kreislaufanlagen bisher nur unzureichend untersucht.

Neben den direkten Auswirkungen kann sich die Schwebstoffbelastung in Kreislaufanlagen auch indirekt durch Verschlechterung der Wasserqualität auf die Fischgesundheit auswirken. So kann es abhängig von der Verweildauer der Partikel im Wasser zu Nährstoffauswaschungen kommen (Chen et al., 2003). Auch kann die übermäßige Zufuhr von Feststoffen die Filter verstopfen und/oder zu einer Verringerung der Oberfläche des gewünschten Biofilms auf dem Trägermaterial der Biofilter führen (Ling und Chen, 2005). Des Weiteren fördert die verstärkte Verfügbarkeit von organischem Kohlenstoff das Wachstum von heterotrophen Bakterien, die deutlich konkurrenzstärker als die gewünschten autotrophen Nitrifizierer sind. Dadurch können die nitrifizierenden Bakterien mit der Zeit verdrängt werden (Blancheton et al., 2013), was sich dann wiederum direkt auf die Wasserqualität auswirken kann.

Ziel dieses Projektes war es daher, den Einfluss sich akkumulierender Kleinstpartikel in Kreislaufanlagen auf die Fischgesundheit und die Systemstabilität zu ergründen. Es sollte untersucht werden, wie das erhöhte Schwebstoffaufkommen in Kreislaufanlagen im Einzelnen die Fischgesundheit, die Wasserqualität und die Biofilterleistung beeinflusst. Im Fokus lag hierbei einerseits der direkte physikalische Einfluss unterschiedlich großer und verschieden zusammengesetzter Partikel auf die Gesundheit und das Wachstum der Fische.

Andererseits war eine umfassende Untersuchung der Auswirkungen des Schwebstoffaufkommens auf die Biofilterleistung und die Wasserparameter ein zentraler Punkt des Versuchsvorhabens. Ein entscheidendes Kriterium bei der Untersuchung war eine weitgehende Entkoppelung der Schwebstoffbelastung von anderen belastenden Wasserparametern (Ammonium, Nitrit, CO₂, pH, etc.). Dies ermöglichte es, den Effekt der Schwebstoffe unbeeinflusst von diesen überlagernden Wasserparametern zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Aufbau Versuchsanlage

Die Versuchsanlage besteht aus zwei identisch aufgebauten Kreislaufsystemen (Abbildung 1) mit jeweils 10 Becken à 330 L Wasservolumen. Die Hälterungsbecken sind parallel geschaltet, so dass jedes Becken separat mit aufbereitetem Wasser versorgt wird. Die Versuchsanlage wird im Vollkreislauf betrieben, d. h. das Systemwasser (Bodenseewasser) wird mechanisch (Trommelfilter der Firma Hydrotech, 100 µm Filtergaze) und biologisch (Wirbelbett-Bioreaktor) aufbereitet, UV-sterilisiert, mit Sauerstoff angereichert und wieder in die Becken eingespeist. Der benötigte Sauerstoff wird über einen hauseigenen Generator produziert. Im Falle eines Defektes stehen Sauerstoffflaschen für die Notversorgung zur Verfügung. Die Wasserzufuhr in den Becken ist so ausgelegt, dass sich ein gleichmäßiges Strömungs- bzw. Sauerstoffprofil in der Wassersäule einstellt und eine für Regenbogenforellen optimale Strömungsgeschwindigkeit herrscht. In jeweils 2 Becken pro Kreislaufanlage werden fortlaufend Temperatur und Sauerstoffgehalt überwacht, dokumentiert und reguliert. Die Raumluft wird ebenfalls temperiert, so dass eine weitgehend konstante Wassertemperatur gewährleistet ist. Die Beleuchtung der Anlage erfolgt mittels Vollspektrumlampen mit einem Lichtregime von jeweils 12 Stunden Dunkelheit bzw. Helligkeit inklusive ca. dreißigminütiger Übergangsphasen (Dämmerung).



Abbildung 1: Teilansicht der Versuchsanlage

3.2 Wasseranalytik

Der pH-Wert wurde vor dem Biofilter gemessen und mit Hilfe von Natriumhydrogencarbonat angeglichen. Im letzten Versuch wurden für die kontinuierliche Überwachung des pH-Werts in beiden Kreisläufen Sonden (pH-Manta Ox-J01 inkl. pH-Sonden, Oxyguard) im Pumpensumpf nach den Trommelfiltern installiert, um eine genaue Einstellung des pH-Werts zu gewährleisten. Bei Unterschreiten des gewünschten pH-Werts wurde wässrige NaHCO_3 -Lösung mit Hilfe einer Pumpe (Concept 420i, SAIER) in die Wasserpuffer der Kreislaufanlagen eingeleitet. Die CO_2 -Konzentration wurde regelmäßig mithilfe eines CO_2 -Messgeräts (CO_2 -Analyser G03C2, OxyGuard) in den Becken der beiden Kreislaufanlagen überprüft.

Für die weitere Wasseranalytik wurden Proben sowohl vor als auch nach dem Biofilter genommen, um die Effektivität der Biofilter zu überwachen. Die Ammonium-Konzentration wurde mit dem Analyse-Kit Ammonium LCK 304 (Hach, 0,02 – 2,5 mg/L) bestimmt. Ab dem zweiten Versuch wurde zusätzlich ein Automat (Amtax SC Ammonium-Analysator, Hach) zur Messung der Ammonium-Konzentration eingesetzt. Dadurch war eine kontinuierliche Überwachung der Ammonium-Konzentration möglich. Für die Bestimmung der Nitrit-Konzentration wurde das Kit Nitrit LCK 341 (Hach, 0,05 – 2 mg/L) und für die Nitrat-Konzentration das Kit Nitrat LCK 339 (Hach, 1 – 6 mg/L) verwendet. Die Bestimmung der Wasserparameter wurde dreimal wöchentlich als Doppelproben durchgeführt.

Für die Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB) wurden pro Kreislauf jeweils Proben vor und nach dem Trommelfilter entnommen. Diese wurden 1:4 mit chlorfreiem Wasser verdünnt, in Karlsruher Flaschen gefüllt, verschlossen und anschließend für 5 Tage dunkel bei 20 ± 1 °C aufbewahrt. Die Differenz der Sauerstoffgehalte zu Anfang und am Ende ergibt den Biochemischen Sauerstoffbedarf für 5 Tage (BSB_5).

3.3 Partikel-Analyse

Partikelkonzentration

Zur Messung der Partikelkonzentration („total suspended solids“ = TSS) wird die Gesamtheit aller Partikel pro Liter, die größer als 0,45 µm sind, bestimmt. Dazu wird ein bestimmtes Volumen an Anlagenwasser mit Hilfe von Druckluft und Cellulose-Acetat-Filtern (Sartorius AG, Porengröße: 0,45 µm) gefiltert. Vor der Filterung werden die Gewichte der einzelnen Filter bestimmt, so dass nach Trocknung (103°C, 2 h) das Gewicht der Filterkuchen bestimmt werden kann (Abbildung 2). Die Wasserproben wurden mit Hilfe eines Schlauches in ca. 30 cm Wassertiefe zu gleichen Anteilen aus fünf Hälterungsbecken pro System entnommen und durchmischt, um so eine repräsentative Probe pro Kreislaufanlage zu erhalten. Die Wasserproben wurden dreimal pro Woche jeweils morgens vor der Fütterung entnommen, um so die geringste Partikelkonzentration ohne den Einfluss der Fütterung und der Reinigung der Becken zu erhalten. Alle Messungen wurden als Doppelproben durchgeführt.



Abbildung 2: Beladene Filter von Wasserproben aus dem Kontroll- (oben) und Belastungskreislauf (unten), jeweils als Doppelproben.

Partikelgrößen-Verteilung

Für die Bestimmung der Partikelgrößen-Verteilung wurden die Wasserproben wie o.g. entnommen. Die Partikelgrößen wurden dann nach Brinker et al. (2005) mit Hilfe eines Lasermessgeräts (GALAI:Cis-1, GALAI Productions Ltd. Migdal Haemak, Israel), ausgerüstet mit einer Dosierpumpe (GALAI:LFC-100) und einer Durchfluss-Küvette (GALAI-GM-7), bestimmt.

3.4 Leistungsparameter der Fische

Die spezifische Wachstumsrate (SWR) wurde aus den Mittelgewichten zu Beginn und am Ende des Versuchs mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$SWR (\%/Tag) = \frac{\ln(\text{Mittelgewicht Ende}) - \ln(\text{Mittelgewicht Start})}{\text{Tag}_{\text{Ende}} - \text{Tag}_{\text{Start}}} * 100$$

Der Futterquotient (FQ) wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$FQ = \frac{\text{Eingesetzte Futtermenge (kg)}}{\text{Zuwachs (kg)}}$$

Der temperaturbereinigte Wachstumskoeffizient (TGC) wurde nach Jobling (2003) mit folgender Formel bestimmt:

$$TGC = \frac{\sqrt[3]{\text{Mittelgewicht}_{\text{Ende}}} - \sqrt[3]{\text{Mittelgewicht}_{\text{Start}}}}{\sum T} * 1000; \text{ mit } \sum T = \text{Summe Tagesgrade}$$

Die Verdaulichkeit des Futters wurde im Langzeitversuch mit Hilfe von Yttriumoxid bestimmt. Dazu wurde pro kg Futter 1 g Yttriumoxid zugefügt. Das Yttriumoxid wurde zuerst in 5 g Rapsöl gelöst und dann mit Hilfe einer Mischtrommel gleichmäßig auf das Futter verteilt. Nach einwöchiger Fütterung mit dem behandelten Futter wurde von ca. 20 Fischen pro Kreislauf durch Abstreifen Kot gewonnen. Der Kot und das verwendete Futter wurden gefriergetrocknet. Anschließend wurde der prozentuale Anteil des Yttriums in Kot und Futter durch das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Sigmaringen bestimmt. Die Verdaulichkeit des Futters (Trockenmasse) wurde unter Verwendung folgender Formel berechnet:

$$\text{Verdaulichkeit (Trockenmasse)} = 100 - \left(100 * \frac{\text{Yttrium Futter (mg/kg)}}{\text{Trockenmasse Futter/100}} * \text{Yttrium Kot (mg/kg)}^{-1}\right)$$

3.5 Gesundheitsparameter

Probenahme-Protokoll

Nach dem Besetzen der Kreislaufanlagen betrug die Eingewöhnungsphase für die Fische mindestens drei Wochen. Vor den Probenahmen wurden die Fische jeweils 24 Stunden nicht gefüttert. Pro Becken wurden zwei Fische, also insgesamt 20 Fische pro Kreislauf, einzeln entnommen und mit Nelkenöl (Konzentration: 0,1 mL/L) betäubt. Nach der Betäubung wurden das Gewicht und die Totallänge jeder Regenbogenforelle bestimmt und Blutproben an der Kaudalvene entnommen. Das Blut wurde in Lithium-heparinisierte Gefäße (25 IU/mL

Blut, Sarstedt) gefüllt. Anschließend wurden die Fische getötet und Kiemenproben für die histologische Untersuchung entnommen. Weitere Gewebeproben der Kiemen, Leber, Haut und Kopfniere wurden für Bestimmung von Hitzeschockprotein 70 entnommen.

Hämatologische Parameter

Die Blutentnahme erfolgte an der Kaudalvene der Regenbogenforellen. Direkt im Anschluss wurden mit Nativblut die Blutausriche hergestellt. Nach der vollständigen Trocknung wurden die Blutausriche mit Hemacolor (Merck) gefärbt. Für das Differentialblutbild wurden pro Blutausrich 200 Leukozyten mäanderförmig ausgezählt. In Abbildung 3 sind die verschiedenen Blutzelltypen der Regenbogenforelle dargestellt.

Die Glukosekonzentration im Blut der Fische wurde mit Hilfe eines herkömmlichen Blutzuckermessgeräts (ACCU-CHEK Aviva, Roche, USA) bestimmt. Für die Bestimmung von Hämatokrit und Leukokrit wurde Blut in heparinisierte Kapillaren gefüllt und für 10 min bei 14000 g in einer Hämatokritzentrifuge (HAEMATOCRIT 210, Hettich) zentrifugiert. Die Hämoglobinkonzentration wurde mit Rinder-Hämoglobin (H2500, Sigma-Adrich) als Standard nach der Cyanmethämoglobin-Methode (Drabkin und Austin, 1932) bestimmt. Vor der Messung des Hämoglobingehalts wurde Zellmaterial mit Hilfe einer Metallöse aus der Probe entfernt. Für die Zählung der Erythrozyten und Leukozyten wurde das Blut 1:200 mit Natt & Harrick-Lösung (Natt und Herrick, 1952) verdünnt und mit Hilfe einer Neubauerkammer ausgezählt. Des Weiteren wurde der mittlere Hämoglobin-Gehalt eines einzelnen Erythrozyten (MCH = mean corpuscular hemoglobin), das mittlere Volumen eines einzelnen Erythrozyten (MCV = mean corpuscular volume) und die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration) anhand folgender Formeln bestimmt:

$$MCH (pg) = \frac{\text{Hämoglobin (g/dL)}}{\text{Erythrozyten (Mio/}\mu\text{L)}} * 10$$

$$MCV (fL) = \frac{\text{Hämatokrit (\%)}}{\text{Erythrozyten (Mio/}\mu\text{L)}} * 10$$

$$MCHC (g/dL) = \frac{\text{Hämoglobin (g/dL)}}{\text{Hämatokrit (\%)}} * 100$$

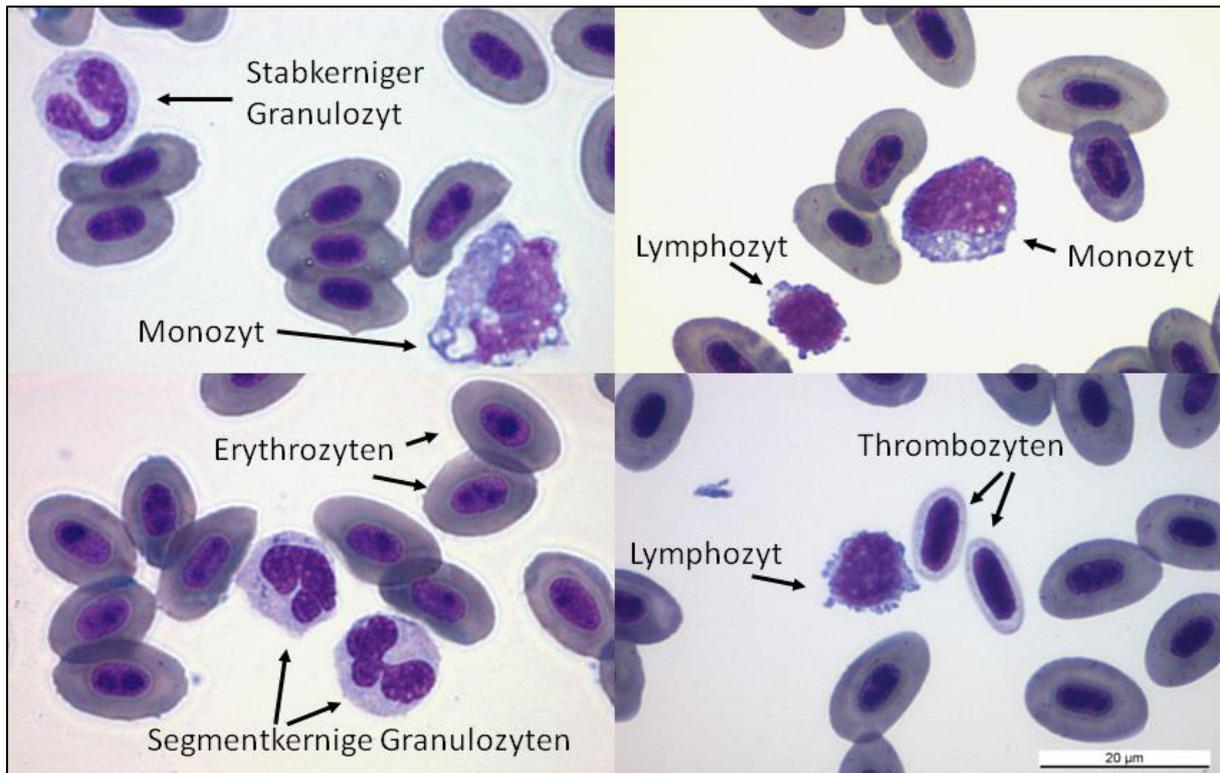


Abbildung 3: Die verschiedenen Blutzellen der Regenbogenforelle.

Flossenzustand

Der Zustand der Flossen der Fische wird in der Aquakultur als ein wichtiger Indikator für das Wohlergehen der Fische gesehen (Ellis, 2002; Turnbull et al., 2005). Daher wurde in diesem Projekt der Grad der Flossenerosion nach Person-Le Ruyet et al. (2007) bestimmt (Abbildung 4). Zusätzlich wurde noch der Flossenindex nach Kindschi (1987) mit folgender Formel berechnet:

$$Flossenindex = \frac{Flossenlänge}{Totallänge} * 100$$

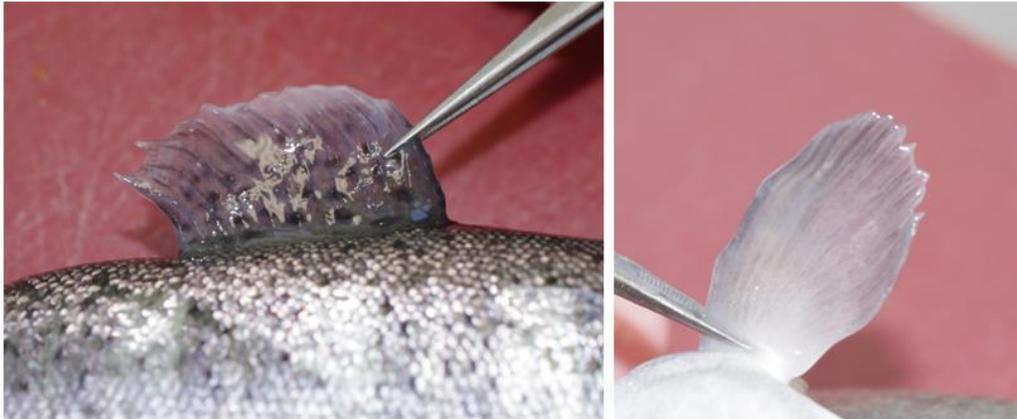


Abbildung 4: Erosionslevel 2 der Rückenflosse und Erosionslevel 1 der linken Brustflosse nach Person-Le Ruyet et al. (2007).

Hitzeschockprotein 70-Konzentration

Hitzeschockprotein 70 (HSP70) ist ein verbreiteter Indikator für Stress in Fischen (Iwama et al., 1998; Yamashita et al., 2010) und auch von großem Interesse bei der Krankheitskontrolle in der Aquakultur (Sung und MacRae, 2013). In ungestressten Organismen fungieren Hitzeschockproteine als Chaperone und helfen bei der Produktion und Faltung von intrazellulären Proteinen und dem Abbau von strukturell anomalen Proteinen (Roberts et al., 2010; Sung and MacRae, 2013). Bei Auftreten eines Stressors wird die Hsp-Produktion hochreguliert, um die zelluläre Homöostase aufrecht zu erhalten (Yamashita et al., 2010). Die Hsp-Reaktion wurde ursprünglich als kurzzeitige Stressantwort gesehen. Inzwischen ist aber bekannt, dass die Hitzeschockproteine auch eine wichtige Rolle bei der Langzeitreaktion des Immunsystems spielen (Roberts et al., 2010).

In diesem Projekt wurde die HSP70-Konzentration mit Hilfe eines antikörperbasierten Nachweisverfahrens, dem sogenannten Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), bestimmt. Dazu wurde ein kommerzielles ELISA-Kit verwendet (SEA873Hu, Cloud-Clone Corp., antibodies-online.com). Gewebe-Homogenate wurden aus der Haut, Leber, Kopfniere und den Kiemen hergestellt. Dazu wurde jeweils 100 mg Gewebe auf Eis homogenisiert und mit 1 mL 1xPBS verdünnt. Die erhaltene Suspension wurde zweimalig eingefroren und aufgetaut, um die Zellmembranen weiter aufzubrechen. Anschließend wurden die Homogenate für 10 min bei 15000 g (Universal 320 R, Hettich) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben und bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren. Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde mit Hilfe eines Bicinchoninsäure-Kits (BCA1, Sigma-Aldrich) bestimmt. Für den ELISA wurden die Leber-, Haut- und Kiemen-

Proben mit 1xPBS auf 20 µl Protein/mL und im Falle der Leberproben auf 1 µg Protein/mL verdünnt. Der ELISA wurde dann wie vom Hersteller angegeben durchgeführt.

Plasmacortisol

Cortisol ist einer der am häufigsten verwendeten Indikator von Stress in Fischen (Mommsen et al. 1999) und reagiert auf eine Vielzahl von Stressoren, die sowohl akut als auch chronisch sein können (Ellis et al 2012).

Für die Messung der Cortisol-Konzentration wurde in diesem Projekt ein kommerziell erhältliches Cortisol ELISA Kit (HZ-1887, Hölzel Diagnostika GmbH) verwendet. Für die Bestimmung der Plasmacortisol-Konzentration wurden die Blutproben für 10 min bei 1000 g (4°C, Universal 320 R, Hettich) zentrifugiert. Das Blutplasma wurde dann in Plastikgefäße überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurde dabei verwendet. Aus dem Plasma wurde das Cortisol mit Hilfe von Ethylacetat extrahiert. Dazu wurden 200 µl Plasma mit 500 µl Ethylacetat vermischt, für 30 Sekunden gevortext und anschließend für 5 min bei 4°C und 1500 g (Universal 320 R, Hettich) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Glasgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach dem Verdampfen des Ethylacetats wurde der Extrakt in 200 µl 1xPBS resuspendiert. Der ELISA wurde dann wie vom Hersteller angegeben durchgeführt.

Kiemen-Histologie

Pro Untersuchung wurden jeweils 20 Regenbogenforellen aus jedem Kreislauf untersucht. Die Kiemenproben wurden direkt nach der Tötung der Fische entnommen und in 10 %igem neutral-gepufferten Formalin fixiert und für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4°C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. Das Gewebe wurde in gestaffelten Ethanol-Konzentrationen dehydriert und dann in Paraffinwachs eingebettet. Die histologischen Schnitte wurde in einer Dicke von 4 – 6µm hergestellt. Die Proben des Kurzversuches wurden mit Haematoxylin und Eosin (HE) (Romeis, 1968) gefärbt, während die Proben der anderen Versuche nach PAS (Periodic Acid Schiff Reaction) gefärbt wurden. Die Schnitte wurden dann unter einem Mikroskop (Zeiss) begutachtet. Für jeden Schnitt wurden 5 Aufnahmen bei 200x Vergrößerung gemacht, die jeweils 6-7 Sekundärlamellen zeigten. Die Struktur des Kiemenepithels und die Sekundärlamellen wurden auf Veränderungen, wie z.B. Verdickung oder ödematöse

unter einem Phasenkontrastmikroskop auf das Vorhandensein von Bakterien untersucht. Des Weiteren wurden mit Hilfe einer sterilen Öse Abstriche von den Kiemen und der angeschnittenen Milz gemacht und Nährböden beimpft. Die Nährböden wurden dann bei 16 °C und 20 °C inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der Bakterienkolonien bewertet und wenn möglich die Bakterienart bestimmt.

Tabelle 1: Im Langzeit-Versuch benutzte Verdünnungen des Anlagewassers mit 0,9 %iger NaCl-Lösung zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten.

	Kreislauf	Becken	Vor UV-Bestrahlung	Nach UV-Bestrahlung
Langzeitversuch	Kontrolle	1 : 100 / 1 : 1000	1 : 10 / 1 : 100	1 : 10 / 1 : 100
	Belastung	1 : 100 / 1 : 1000	1 : 100 / 1 : 1000	1 : 10 / 1 : 100

Bactiquant-Methode

Im letzten Versuch wurde die bakterielle Aktivität im Anlagewasser mit der Bactiquant-Methode der Firma Mycometer (Dänemark) gemessen (Abbildung 6). Dabei handelt es sich um eine indirekte Messung der mikrobiellen Aktivität auf Grundlage der bakteriellen Hydrolase-Aktivität (Reeslev et al., 2011). Die bakterielle Hydrolyse-Aktivität wird dabei als so genannte „arbitrary fluorescence units“ (AFU) gemessen. Der Bactiquant-Wert ist eine dimensionslose Größe und spiegelt die Anzahl der Bakterien und ihre enzymatische Aktivität in einer bestimmten Wasserprobe unter Einfluss von Probenvolumen, Reaktionszeit und Inkubationstemperatur wieder. Die mikrobiellen Enzyme in einer Wasserprobe hydrolysieren ein synthetisches fluoreszierendes Enzymsubstrat, wodurch fluorophore Stoffe ins Wasser abgegeben werden. Diese werden dann mit Hilfe eines Fluorometers quantifiziert. Für die Messung wurde jeweils eine 10 mL Wasserprobe direkt nach der Entnahme gefiltert, dann für 15 min mit der Reaktionslösung bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich im Fluorometer gemessen.

Ein großer Vorteil der Bactiquant-Methode ist im Vergleich zum herkömmlichen Plattenverfahren, dass sie weniger zeitintensiv ist und man innerhalb weniger Minuten Aussagen nicht nur über Konzentrationen sondern auch über die bakterielle Aktivität im Probenwasser treffen kann. Im Folgenden werden die Bactiquant-Werte als bakterielle Aktivität aufgeführt.



Abbildung 6: Messung der bakteriellen Aktivität mit der Bactiquant-Methode.

4 Experiment 1: Fütterungsversuch mit konventionellen Futtermitteln

4.1 Versuchsdurchführung

Hintergrund dieses Experiments war es, zum einen den Einfluss von zwei verschiedenen kommerziellen Futtermitteln auf die wichtigsten Wasserparameter im Vollkreislauf zu analysieren und zum anderen die dadurch entstehende Partikelbelastung zu untersuchen. Die eingesetzten Futter wurden so gewählt, dass sie möglichst unterschiedliche Partikelgrößenverteilungen im System erzeugen. Daher wurde ein speziell für Kreislaufanlagen konzipiertes Futter (ORBIT 929, BioMar) und ein herkömmliches Futter (EFICO ALPHA 717, BioMar) verwendet. Aufgrund der Zusammensetzung des Futters EFICO ALPHA 717 (höherer Rohfaser- und Aschegehalt, s. Tabelle 2) wurde erwartet, dass im Vergleich zu ORBIT 929 ein deutlich höheres Partikelauftreten entsteht.

Tabelle 2: Zusammensetzung des verwendeten Futters (Herstellerangaben).

	Orbit 929	EFICO ALPHA 717
Rohprotein (%)	41 – 45	39 – 43
Rohfett (%)	29 – 32	21 – 24
Kohlenhydrate (%)	15,6	19,3
Rohfaser (%)	1,0	5,3
Asche (%)	5,0	5,9
Totaler Phosphor (%)	0,8	0,9
Bruttoenergie (MJ/kg)	24 – 26	21 – 24
Verdauliche Energie (MJ/kg)	21,9	17,8
Weitere Angaben	Fischmehl, Weizen, Rapsöl, Hämoglobinmehl, Weizengluten, Sojakonzentrat, Fischöl, Erbsenprotein	Fischmehl, Blutmehl, Sojakuchen, Rapsmehl, Sonnenblumenkuchen, Weizen, Fischöl, Rapsöl, Guarproteinmehl, Erbsen, Pferdebohnen, Sojakonzentrat

Im November 2013 wurde das erste Experiment gestartet, jedoch am 23.12.2013, ausgelöst durch den Ausbruch von Rotmaulseuche (*Yersinia ruckeri*), aufgrund von erhöhter Mortalität der Versuchsfische abgebrochen. Am 16.01.2014 wurde die Wiederholung des Fütterungsexperiments gestartet. Dazu wurden pro Kreislauf jeweils ca. 620 Regenbogenforellen (rein weiblich, Fischzucht Störk) mit einem Durchschnittsgewicht von ca. 80 g eingesetzt.

In der Eingewöhnungsphase (Normalisieren der Stressparameter) von drei Wochen wurden die Fische beider Kreisläufe mit EFICO Enviro 921 (BioMar) *ad libitum* gefüttert. Während dieser Zeit betrug die Gazegröße der Trommelfilter 12 µm, so dass die Partikelbelastung gering gehalten wurde. Nach der Eingewöhnungsphase wurde eine 60 µm Gaze verwendet.

Aufgrund von hoher Aggressivität zwischen den Regenbogenforellen kam es zu einem Ausfall von ca. 100 Fischen, so dass das eigentliche Experiment mit 65 Fischen pro Becken gestartet werden musste. Nach Ablauf der Eingewöhnungsphase wurden die Fische einzeln gewogen, gemessen und auf die Becken aufgeteilt. Angeschlagene bzw. sehr kleine Fische wurden aussortiert. Nach der Sortierung bzw. Wägung war kaum noch aggressives Verhalten bei den Fischen zu beobachten. Die Mortalität unterschied sich während des Experiments nicht signifikant ($P > 0,05$) zwischen den Kreisläufen und betrug bei Fütterung von ORBIT 929 1,45 % (9 Fische) bzw. bei Fütterung von EFICO ALPHA 717 1,12 % (7 Fische).

Die Fische je eines Kreislaufs wurden mit dem Futter ORBIT 929 bzw. EFICO ALPHA 717 gefüttert (jeweils 4,5 mm). Anfänglich betrug die Futtermenge 1,8 % des Fischgewichts, im Laufe des Experiments wurde die Futtermenge stufenweise verringert und betrug am Ende des Versuchs 1,0 % des Fischgewichts. Die Fische wurden an sechs Tagen in der Woche (Sonntag-Freitag) gefüttert, die restriktive Futtergabe erfolgte jeweils am Morgen zu ca. 30 % per Handfütterung, um einen Überblick über die Futteraufnahme und das Verhalten der Fische zu erhalten. Das restliche Futter wurde mittels Futterautomaten kontinuierlich über den Tag verteilt verfüttert. Aufgrund eines Lieferengpasses bei BioMar, wurde die Futtergröße bei ORBIT 929 am 11.04.2014 von 4,5 mm auf 3,0 mm umgestellt.

Die Probenahmen erfolgten an drei verschiedenen Zeitpunkten: zum Start, in Woche 8 und in Woche 14 am Ende des Experiments. Die Wägung der Fische wurde zu Beginn und am Ende des Experiments durchgeführt.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Wasserparameter

Wasserverbrauch

Der Wasserverbrauch der beiden Kreisläufe unterschied sich voneinander. Der durchschnittliche Wasseraustausch betrug während des Experiments im bei Fütterung mit ORBIT 929 433,64 L/Tag und bei Fütterung mit EFICO ALPHA 7171 B 512, 49 L/Tag.

Ammonium-Stickstoff

Die mittlere Ammonium-Stickstoff-Konzentration ($\text{NH}_4\text{-N}$) unterschied sich sowohl vor als auch nach dem Biofilter signifikant voneinander ($P < 0,01$, Abbildung 7). Es zeigte sich bei beiden Kreisläufen ein ähnlicher Verlauf (Abbildung 8), die $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration bei Fütterung mit EFICO ALPHA 7171 war jedoch fast während des gesamten Versuchszeitraums geringfügig niedriger als bei Fütterung mit ORBIT 929. Im Mittel betrug die $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration bei Fütterung mit ORBIT 929 $0,52 \pm 0,12$ mg/L vor dem Biofilter bzw. $0,20 \pm 0,06$ mg/L nach dem Biofilter, bei Fütterung mit EFICO ALPHA 717 $0,46 \pm 0,10$ mg/L bzw. $0,17 \pm 0,04$ mg/L. Die daraus resultierende Reinigungsleistung des Biofilters unterschied sich jedoch nicht signifikant ($P > 0,05$) zwischen den Kreisläufen (ORBIT 929: $61,86 \pm 3,95$ %, EFICO ALPHA 717: $62,21 \pm 3,08$ %). Insgesamt blieb die $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration in beiden Kreisläufen deutlich unterhalb des kritischen Levels für Salmoniden von 1 mg/L (bei neutralem pH und für Salmoniden unkritischer Temperatur).

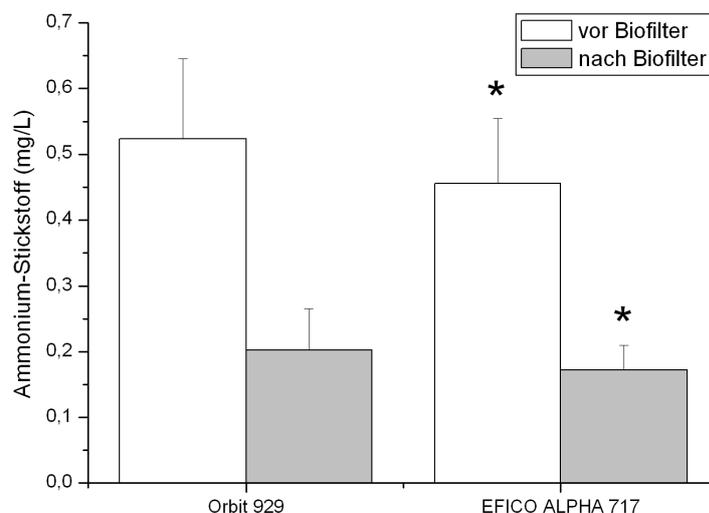


Abbildung 7: Mittlere Ammonium-Stickstoff-Konzentration (mg/L) vor und nach dem Biofilter bei Fütterung mit ORBIT 929 und EFICO ALPHA 717. Gekennzeichnete Mittelwerte (*) unterscheiden sich signifikant vom anderen Kreislauf ($P < 0,01$).

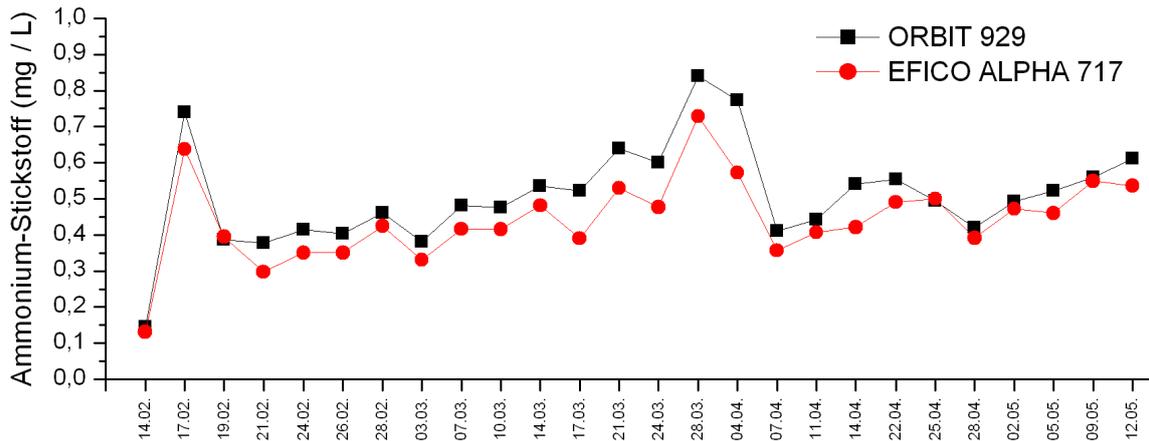


Abbildung 8: Ammonium-Stickstoff-Konzentration (mg/L) vor dem Biofilter im zeitlichen Verlauf des Experiments bei Fütterung mit ORBIT 929 und EFICO ALPHA 717.

Nitrit-Stickstoff

Zwischen den mittleren Nitrit-Stickstoff-Konzentrationen ($\text{NO}_2\text{-N}$) der beiden Kreisläufe (Abbildung 9) zeigte sich sowohl vor als auch nach dem Biofilter ein signifikanter Unterschied ($P < 0,0001$). Vergleicht man die $\text{NO}_2\text{-N}$ -Konzentrationen im zeitlichen Verlauf (Abbildung 10), fallen größere Unterschiede zu Beginn und zum Ende des Experiments auf. Insgesamt betrug die mittlere $\text{NO}_2\text{-N}$ -Konzentration bei Fütterung mit ORBIT 929 $0,28 \pm 0,07$ mg/L bzw. $0,22 \pm 0,06$ mg/L (vor/nach dem Biofilter) und bei Fütterung mit EFICO ALPHA 717 $0,19 \pm 0,04$ mg/L bzw. $0,15 \pm 0,04$ mg/L. Die daraus resultierende Reinigungsleistung des Biofilters unterschied sich jedoch nicht signifikant ($P > 0,05$) zwischen den Kreisläufen (ORBIT 929: $21,01 \pm 10,88$ %, EFICO ALPHA 717: $20,18 \pm 10,42$ %). Sie wies jedoch im zeitlichen Verlauf jeweils große Schwankungen auf.

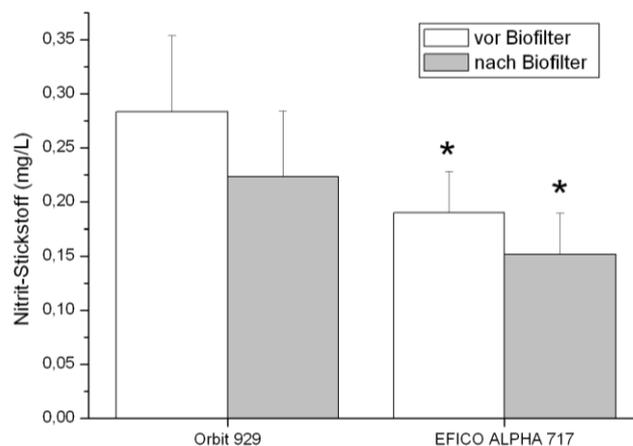


Abbildung 9: Mittlere Nitrit-Stickstoff-Konzentration (mg/L) vor und nach dem Biofilter bei Fütterung mit ORBIT 929 und EFICO ALPHA 717. Gekennzeichnete Mittelwerte (*) unterscheiden sich signifikant vom anderen Kreislauf ($P < 0,0001$).

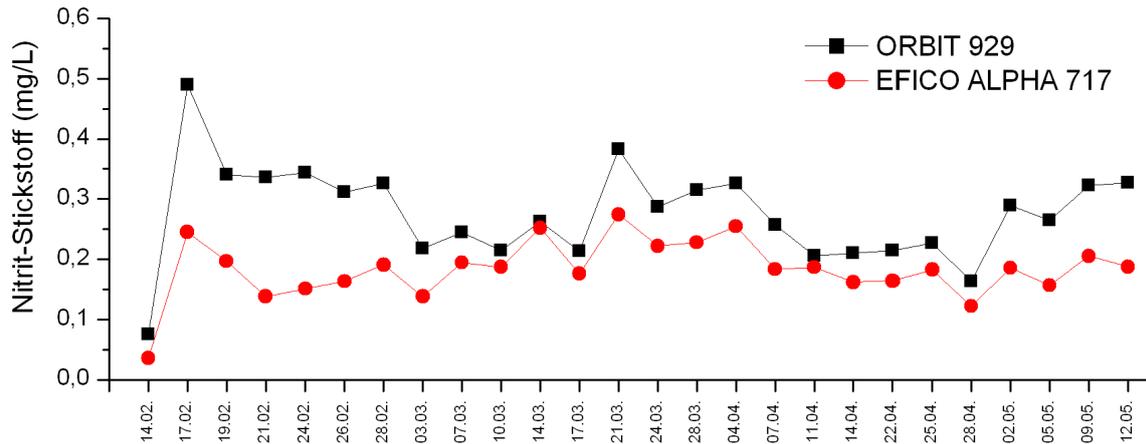


Abbildung 10: Nitrit-Stickstoff-Konzentration (mg/L) vor dem Biofilter im zeitlichen Verlauf des Experiments bei Fütterung mit ORBIT 929 und EFICO ALPHA 717.

Nitrat-Stickstoff

Zu Beginn des Experiments wiesen beide Kreisläufe eine ähnliche Nitrat-Stickstoff-Konzentration ($\text{NO}_3\text{-N}$) auf (Abbildung 11). Ab Woche 7 stieg diese jedoch stetig im Kreislauf mit ORBIT 929 als Futter bis zu einem Maximum von 203,37 mg/L weiter an, während sie sich im Kreislauf mit EFICO ALPHA 717 als Futter um einen Wert von ca. 110 mg/L bewegte. Insgesamt ergab sich dabei ein signifikanter Effekt ($P < 0,01$) zwischen den Kreisläufen.

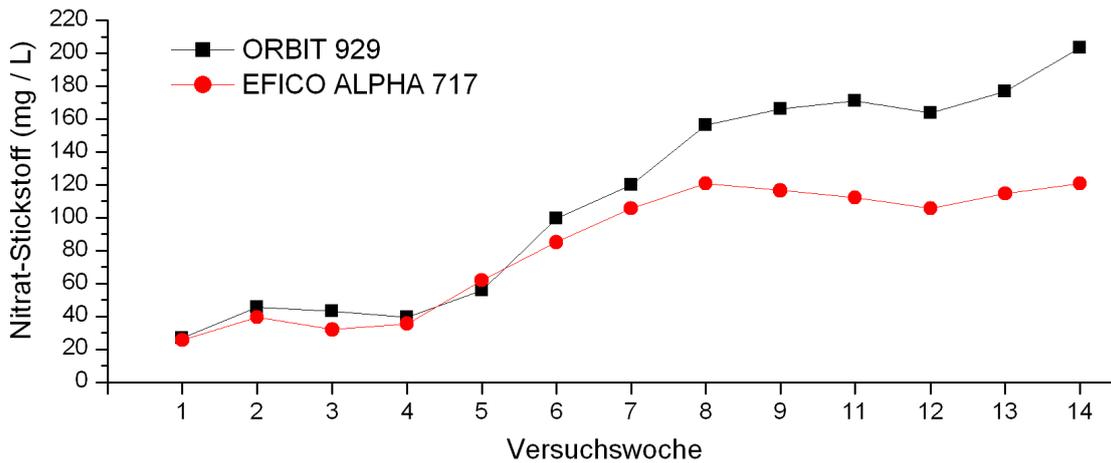


Abbildung 11: Nitrat-Stickstoff-Konzentration (mg/L) nach dem Biofilter im zeitlichen Verlauf des Experiments bei Fütterung mit ORBIT 929 und EFICO ALPHA 717.

CO₂-Konzentration

Die CO₂-Konzentration war im Kreislauf mit ORBIT 929 als Futter sowohl in den Becken ($17,75 \pm 1,29$ mg/L) als auch nach der Verrieselung ($6,56 \pm 1,01$ mg/L) signifikant höher ($P < 0,0001$) als im Kreislauf mit EFICO ALPHA 717 als Futter (Becken: $13,67 \pm 1,07$ mg/L; nach Verrieselung: $4,11 \pm 0,33$ mg/L).

Biochemischer Sauerstoffbedarf

Das Futter hatte keinen signifikanten Effekt auf die mittleren BSB₅-Werte ($P > 0,05$). Vor dem Trommelfilter betrug der BSB₅ bei Fütterung von ORBIT 929 $10,41 \pm 2,66$ mg/l und bei Fütterung mit EFICO ALPHA 717 $10,63 \pm 1,63$ mg/L, nach dem Trommelfilter $8,32 \pm 1,22$ mg/L bzw. $8,54 \pm 1,31$ mg/L. In Abbildung 12 ist der zeitliche Verlauf der BSB₅-Werte vor und nach dem Trommelfilter in beiden Kreisläufen dargestellt.

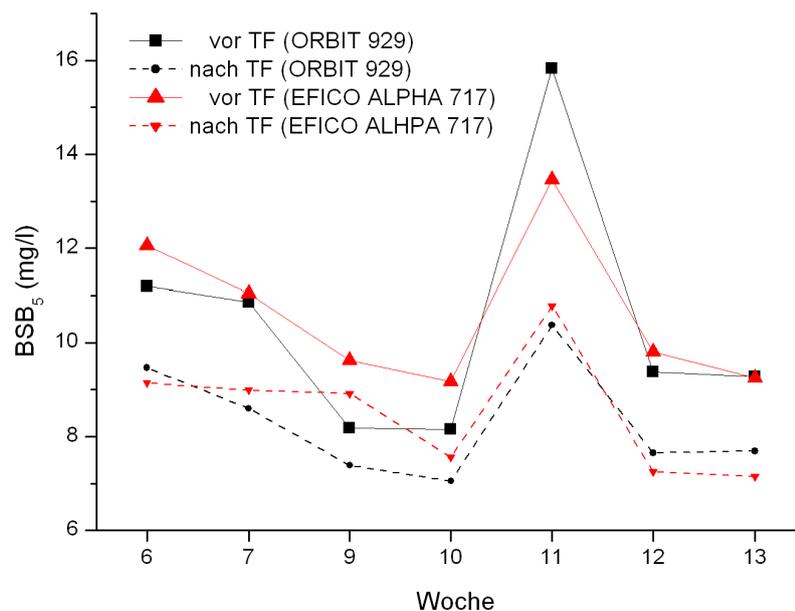


Abbildung 12: Biochemischer Sauerstoffbedarf (BSB₅) im zeitlichen Verlauf des Experiments bei Fütterung mit ORBIT 929 und EFICO ALPHA 717; TF = Trommelfilter.

4.2.2 Partikel-Analyse

TSS-Konzentration

Die mittlere TSS-Konzentration fiel bei Fütterung mit EFICO ALPHA 717 sowohl in den Becken ($6,53 \pm 1,70$ mg/L) als auch nach dem Trommelfilter ($4,06 \pm 1,49$ mg/L) höher aus als bei Fütterung mit ORBIT 929 (Becken: $5,54 \pm 1,39$ mg/L, nach Trommelfilter: $3,61 \pm 1,59$ mg/L), jedoch war der Unterschied nicht signifikant ($P > 0,05$). Im zeitlichen Verlauf (Abbildung 13) zeigte sich eine deutliche Abnahme der TSS-Konzentration bei beiden Futtermitteln sowohl in den Versuchsbecken als auch nach dem Trommelfilter. Die Reinigungsleistung der Trommelfilter unterschied sich nicht signifikant ($P > 0,05$) voneinander (ORBIT 929: $34,86 \pm 13,72$ %, EFICO ALPHA 717: $39,27 \pm 6,79$ %).

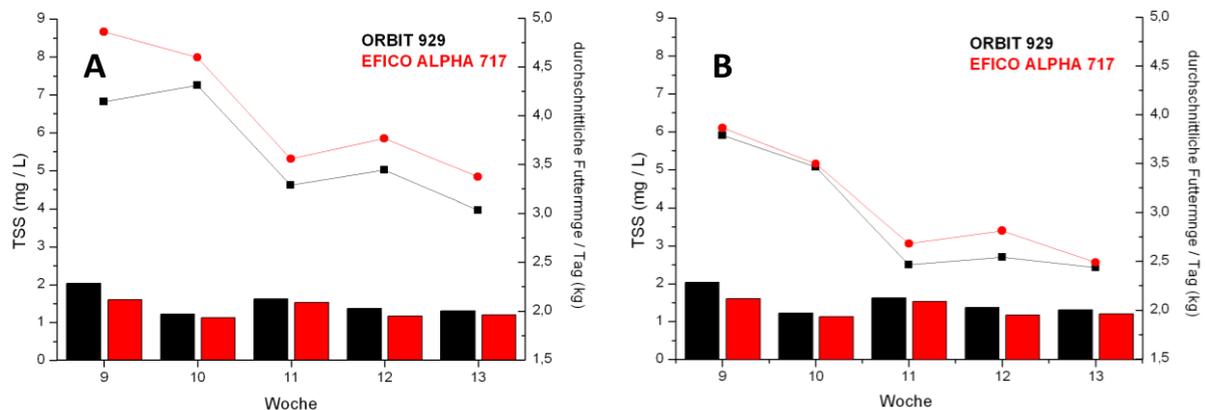


Abbildung 13: Total Suspended Solids (TSS) (A) in den Versuchsbecken und (B) nach dem Trommelfilter (Linien-Diagramm) und durchschnittliche Futtermenge pro Tag (Balkendiagramm) der Versuchswochen 9-13 bei Fütterung mit ORBIT 929 und EFICO ALPHA 717.

Partikelgrößenverteilung

Die Analyse der Partikelgrößen-Klassen ergab keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen den beiden Kreislaufsystemen. Sowohl bei Fütterung mit ORBIT 929 als auch bei Fütterung mit EFICO ALPHA 717 dominierten die Größenklassen kleiner als $20 \mu\text{m}$ und machten 97,9 % bzw. 97,7 % aller Partikel aus.

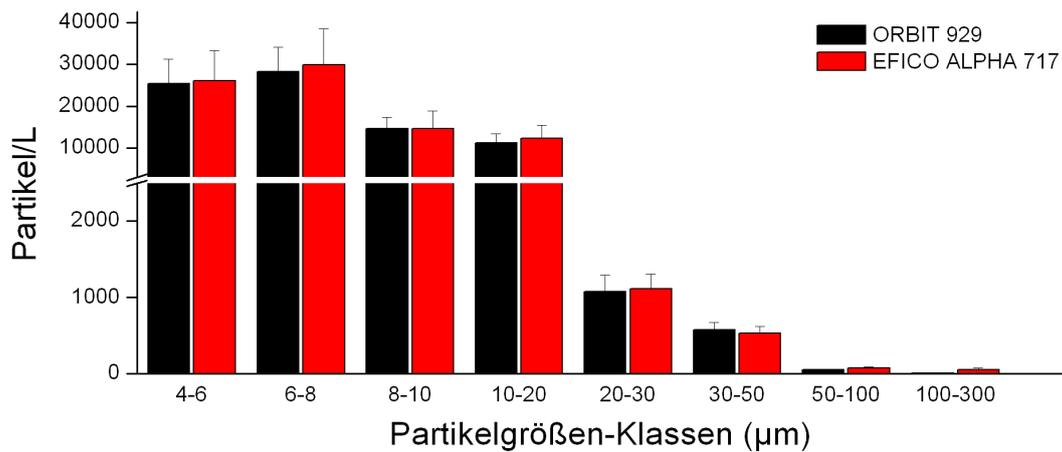


Abbildung 14: Absolute Häufigkeiten der Partikelgrößen-Klassen bei Fütterung mit ORBIT 929 und EFICO ALPHA 717 (je n = 4). Es wurden keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) gefunden. Bitte die Achsenunterbrechung der Y-Achse beachten.

4.2.3 Leistungsparameter der Fische

Die Besatzdichte zum Start des Experiments betrug $21,9 \pm 0,8 \text{ kg m}^{-3}$ (Orbit 929) bzw. $21,4 \pm 0,7 \text{ kg m}^{-3}$ (EFICO ALPHA 717), dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($P > 0,05$). Die Überlebensrate betrug bei Fütterung mit ORBIT 929 98,5 % und bei Fütterung mit EFICO ALPHA 717 98,9 % und unterschied sich nicht signifikant ($P > 0,05$). Sowohl die mittleren Endgewichte von $381,0 \pm 87,6 \text{ g}$ (ORBIT 929) bzw. $331,7 \pm 84,6 \text{ g}$ (EFICO ALPHA 717), als auch der Futterquotient (ORBIT 929: $1,02 \pm 0,03 \%$, EFICO ALPHA 717: $1,17 \pm 0,04 \%$) unterschieden sich signifikant ($P < 0,0001$) zwischen den zwei verwendeten Futtermitteln.

4.2.4 Hämatologie

Hämoglobin

Bei den Hämoglobinwerten der Fische zeigten sich an den verschiedenen Probenahmezeitpunkten keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen den beiden Kreisläufen (Abbildung 15). Der mittlere Hämoglobinwert betrug bei Fischen mit ORBIT 929 als Futter $7,72 \pm 0,78 \text{ g/dL}$ und bei Fischen mit EFICO ALPHA 717 als Futter $7,52 \pm 0,69 \text{ g/dL}$.

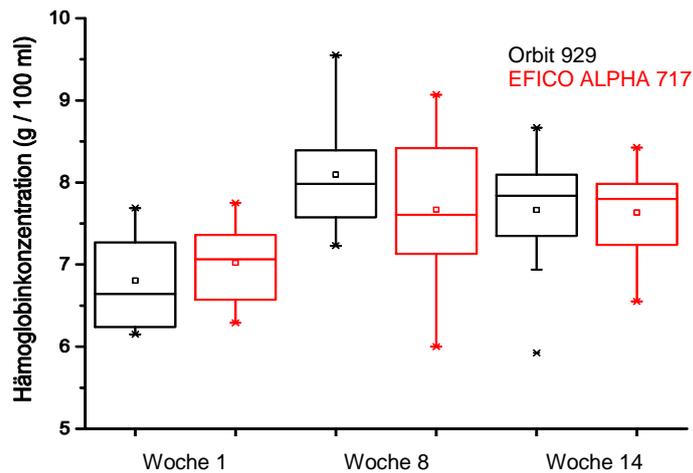


Abbildung 15: Hämoglobin-Konzentration der Versuchsfische in Woche 1 (n = 10), Woche 8 und Woche 14 (je n = 20).

Zellzahlen

Die Gesamtzahlen der Erythrozyten der Versuchsfische beider Kreisläufe unterschieden sich in Versuchswoche 8 nicht signifikant ($P > 0,05$) voneinander (Abbildung 16). In der 14. Versuchswoche zeigten die Versuchsfische mit EFICO ALPHA 717 als Futter hingegen signifikant geringere Erythrozytenzahlen als die Fische mit ORBIT 929 als Futter ($P < 0,05$).

Im Kreislauf mit Fütterung von ORBIT 929 betrug die Erythrozytenzahl zwischen 0,85 – 1,43 Mio. Erythrozyten/ μ l Blut mit einer mittleren Erythrozytenzahl von $1,08 \pm 0,12$ Mio. Erythrozyten/ μ l Blut. Im Kreislauf mit Fütterung von EFICO ALPHA 717 reichten die Erythrozytenzahlen von 0,77 bis 1,43 Mio. Erythrozyten/ μ l Blut mit einer mittleren Erythrozytenzahl von $1,03 \pm 0,15$ Mio. Erythrozyten/ μ l Blut.

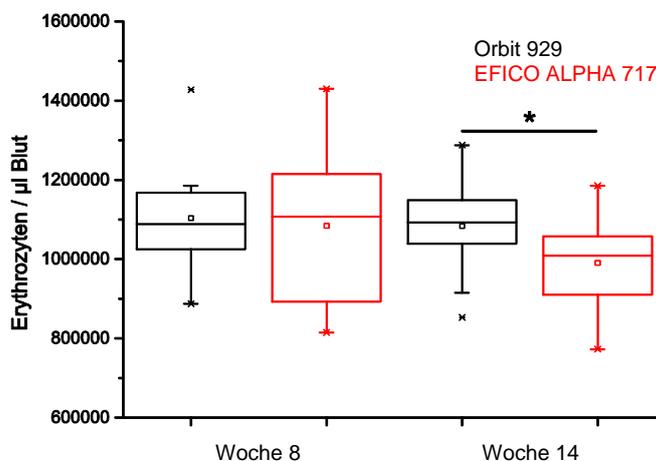


Abbildung 16: Gesamtzahl der Erythrozyten; jeweils n = 20.

Hämatokrit

Die Hämatokritwerte der Forellen unterschieden sich in Woche 8 signifikant voneinander ($P < 0,05$), während in Woche 1 und 14 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kreisläufen vorlagen (Abbildung 17).

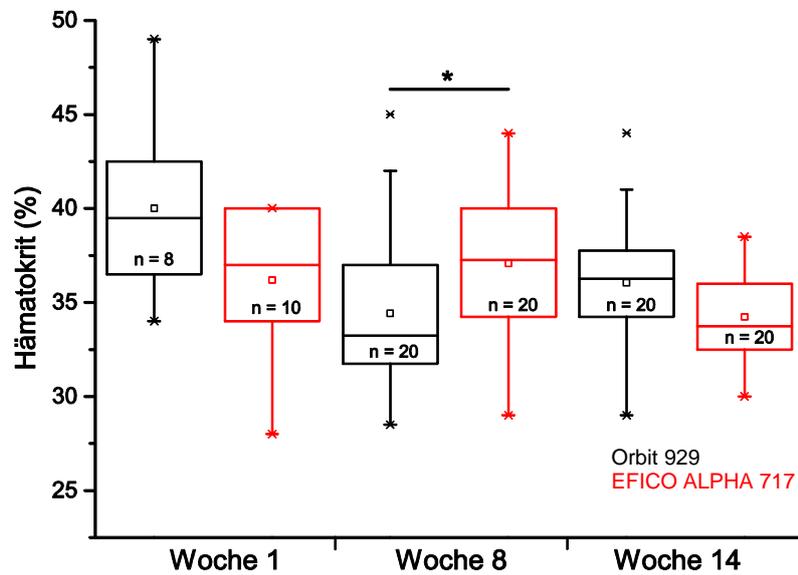


Abbildung 17: Hämatokritwerte der Versuchsfische.

4.3 Diskussion

Es wurde vermutet, dass durch das für Kreislaufanlagen konzipierte Futter ORBIT 929 im Gegensatz zu dem herkömmlichen Futter EFICO ALPHA 717 eine bessere Wasserqualität erreicht werden kann. Es zeigte sich jedoch, dass die gemessenen Wasserparameter im Kreislaufsystem mit ORBIT 929 als Futter, trotz des vermeintlich besseren Futters, schlechter waren als im Kreislaufsystem mit EFICO ALPHA 717 als Futter. Da die Biofilter nicht annähernd an ihre Leistungsgrenze gebracht worden sind, ist dies mit hoher Wahrscheinlichkeit auf kompensatorische Effekte der Biofilter und in kleinerem Rahmen auf den unterschiedlichen Wasserverbrauch in den beiden Systemen zurückzuführen, so dass die niedrigen Werte im Kreislauf mit EFICO ALPHA 717 als Futter vermutlich durch den höheren Wasseraustausch und nicht durch das verwendete Futter hervorgerufen wurden. Der höhere Wasserverbrauch entstand aufgrund von höheren Spülfrequenzen des Trommelfilters im Kreislauf mit EFICO ALPHA 717 als Futter.

Hinsichtlich der Partikelbelastung wurde damit gerechnet, dass es aufgrund des höheren Rohfaser- und Aschegehalts im Futters EFICO ALPHA 717 zu einer höheren Partikelkonzentration kommen würde, da dies die Trockensubstanzverdaulichkeit beeinträchtigt (Hilton et al., 1983). Es zeigte sich jedoch, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kreisläufen gab. Die verwendeten Biofilter der Versuchsanlage sind pro Kreislauf für 4,5 kg Futter/Tag ausgelegt, jedoch wurden pro Kreislauf nur max. 2,2 kg Futter/ Tag gefüttert. Dadurch wurden die Biofilter nicht an ihre Leistungsgrenze gebracht, so dass es anscheinend zu einer verstärkten Zersetzung der Partikel durch Bakterien kam, was die Abnahme der Partikelkonzentration erklären könnte. Auch wurde erwartet, dass es im Laufe des Experiments zu einer Anreicherung von Partikeln kommt (Chen et al., 1993) (Davidson et al., 2009). Es kam jedoch im zeitlichen Verlauf des Versuchs bei beiden Kreisläufen zu einer Abnahme der TSS-Konzentration, was vermutlich wiederum auf die hohe Effektivität der Biofilter zurückzuführen ist.

Die Leistungsparameter der Fische zeigten sowohl beim Endgewicht als auch beim Futterquotient deutlich bessere Werte im Kreislauf mit ORBIT 929 als Futter, da es sich bei ORBIT 929 um das hochwertigere Futter handelt. Denn Orbit 929 weist eine deutlich höhere verdauliche Energie aufgrund von höheren verdaulichen Rohprotein- und Rohfettanteilen bei gleichzeitig verringertem Rohfaseranteil auf als EFICO ALPHA 717.

Die hämatologischen Parameter zeigten leichte Schwankungen im Laufe des Untersuchungszeitraums, die jedoch nicht eindeutig als Auswirkungen der unterschiedlichen Futtermittel interpretiert werden können. Auffällig war, dass in Woche 1 der Hämoglobinwert von Fischen beider Kreisläufe deutlich geringer ausfällt, als in Woche 8 bzw. 14. Dies ist vermutlich auf Änderungen bei der Probenahme zurückzuführen, da bei Probenahme 1 Blut durch Herzpunktion entnommen wurde, während die Blutentnahme bei Probenahme 2 und 3 nur noch an der Kaudalvene erfolgte. Auch saisonale Schwankungen des Hämoglobinwerts, die unabhängig von der Wassertemperatur vorkommen (Denton und Yousef, 1975), können für den Unterschied verantwortlich sein, da aber das Experiment im Vollkreislauf bei gleichbleibenden äußeren Faktoren durchgeführt wurde, ist dies jedoch eher unwahrscheinlich.

Insgesamt zeigte dieser Versuch, dass allein durch die Verwendung von verschiedenen Futtermitteln kein ausreichender Unterschied in der Partikelkonzentration bzw. Partikelgrößenverteilung erzielt werden konnte, so dass eine andere Methode zur Partikel-Anreicherung gefunden werden musste.

5 Etablierung der Partikelanreicherung

Um eine gezielte Partikelanreicherung zu erreichen, wurden zwei verschiedene Methoden getestet. Bei der ersten Methode wurde das Spülwasser der Trommelfilter aufgefangen und der darin enthaltene Fischkot gesammelt und in einem Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurde der getrocknete Fischkot gemörsert und mit Hilfe einer Achat-Mühle zu feinem Pulver zerkleinert. Dieses Pulver wurde dann mit Wasser vermischt und in regelmäßigen Abständen in den Wasserpuffer der Kreislaufanlage gegeben (Abbildung 18). Es stellte sich jedoch heraus, dass das Pulver sehr hydrophob war, sich somit nur schwer im Wasser verteilte und aufgrund von Verklumpung durch die Trommelfilter wieder entnommen wurde. Dadurch konnte auch nach mehrwöchiger Testphase keine Erhöhung der Partikelkonzentration erreicht werden, so dass diese Methode verworfen wurde.

Bei der zweiten Methode wurde das Spülwasser des Trommelfilters, das bei Normalbetrieb in die Kanalisation geleitet wird, in einem Becken aufgefangen und mit Hilfe einer Schlammpumpe (Wilo-EMU KS 8 ES, Daten s. Tabelle 3) in den Wasserpuffer der Anlage gepumpt. Durch die Verwendung der Pumpe wurden größere Partikel durch die herrschenden Scherkräfte weiter zerkleinert (McMillan et al., 2003), was eine Anreicherung von Kleinstpartikeln begünstigte. Das Pumpintervall wurde durch einen stetigen Wasserzufluss aus dem Biofilter in das Auffangbecken geregelt. Diese Methode stellte sich als geeignet heraus und wurde im weiteren Verlauf des Projekts zur Partikelanreicherung verwendet.

Tabelle 3: Daten der zur Partikelanreicherung verwendeten Schlammpumpe Wilo-EMU KS 8 ES.

Wilo-EMU KS 8 ES	
Nennzahl	2900 rpm
Freier Kugeldurchgang	9 mm
Maximaler Betriebsdruck	1,8 bar
Max. Fördermenge	23 m ³ /h

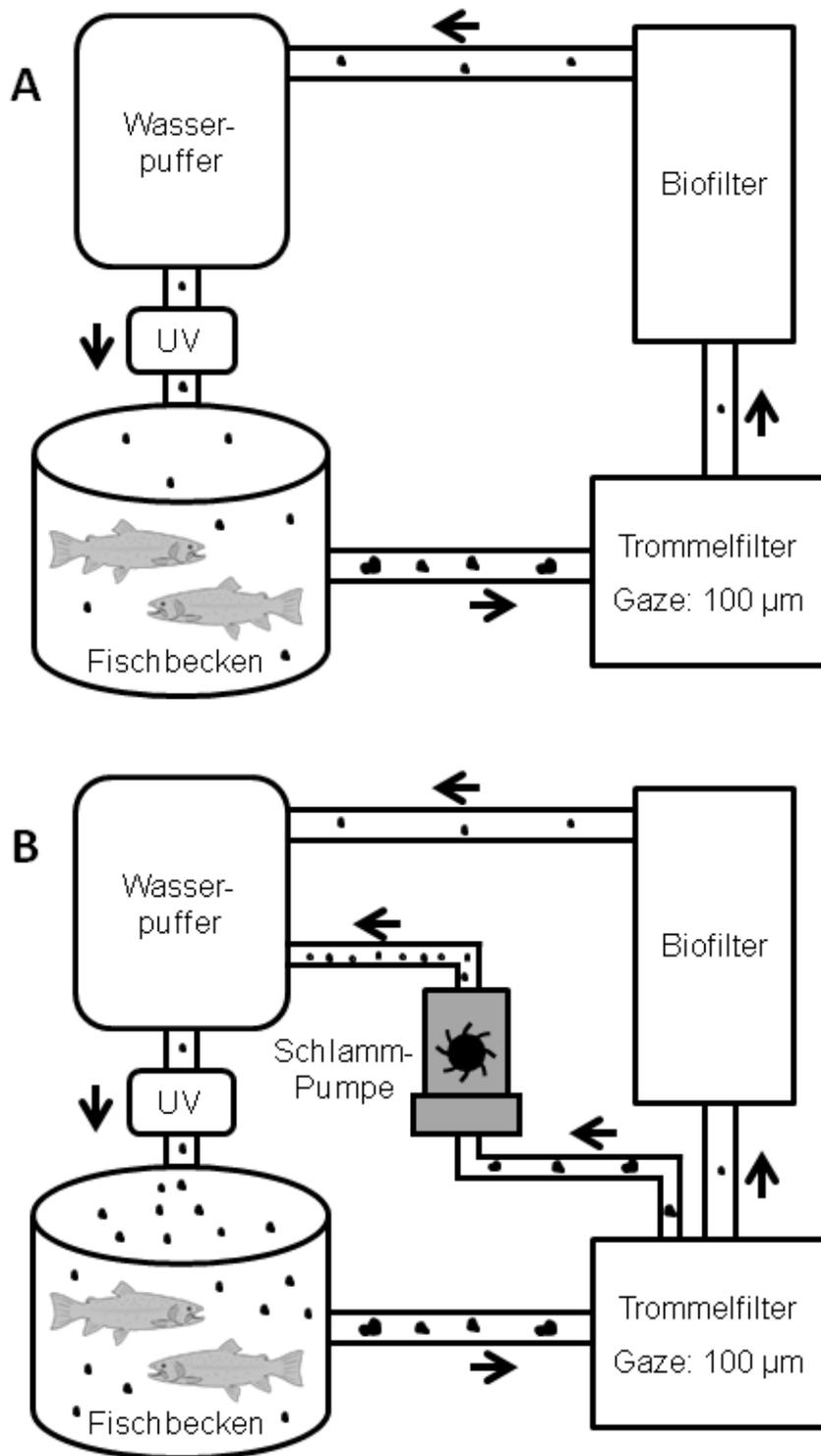


Abbildung 18: Schema der Versuchsreislaufanlage im Normalbetrieb (A) und mit Einsatz der Schlamm-pumpe zur Partikelanreicherung (B).

6 Experiment 2: Kurzzeit-Exposition bei einer Partikelkonzentration von über 25 mg/L

6.1 Versuchsdurchführung

In diesem Versuch wurden die Auswirkungen einer Schwebstoffbelastung von etwa 25 mg/L auf die Physiologie der Regenbogenforellen über einen Zeitraum von 4 Wochen untersucht. Dazu wurde ein Kreislaufsystem als Kontrolle verwendet und unter Normalbedingungen mit deutlich niedriger TSS-Konzentration betrieben. Ein repliziertes Kreislaufsystem wurde als Belastungskreislauf verwendet und die Partikelbelastung mit Hilfe der Partikelanreicherung auf über 25 mg/L erhöht (vgl. Kapitel 5). Die wichtigste Voraussetzung für dieses Experiment war die Entkopplung der Schwebstoffbelastung von anderen potentiell Effekte-überlagernden Wasserparametern. Um dies zu erreichen, wurden die Fischzucht-relevanten Wasserparameter in beiden Kreisläufen vergleichbar gehalten und grundsätzlich darauf geachtet, dass kritische Grenzwerte für Regenbogenforellen nicht überschritten wurden.

Pro Kreislaufsystem wurden ca. 650 Regenbogenforellen (rein weiblich, Fischzucht Störk) eingesetzt und bis zu einer maximalen Besatzdichte von $54 \pm 3 \text{ kg m}^{-3}$ (Kontrolle) bzw. $52 \pm 4 \text{ kg m}^{-3}$ (Belastung) gehalten. Die Fische wurden an sechs Tagen in der Woche (Sonntag-Freitag) gefüttert. Die restriktive Futtergabe erfolgte jeweils am Morgen zu ca. 30 % per Handfütterung, das restliche Futter wurde mittels Futterautomaten kontinuierlich über den Tag verteilt verfüttert. Als Futter wurde für beide Kreisläufe EFICO Enviro 921 (Biomar, Dänemark, Zusammensetzung s. Tabelle 4) verwendet. Zu Beginn des Versuchs betrug die Futtermenge 1,4 % des Körpergewichts und wurde im Laufe des Experiments entsprechend der Gewichtsentwicklung der Forellen auf 1,1 % verringert. Die Probenahmen inklusive Wägung erfolgten bei diesem Versuch zum Start und nach vier Wochen am Ende des Experiments.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Futters Efico Enviro 921 (Herstellerangaben).

Futter-Zusammensetzung	3 mm
Rohprotein (%)	46-49
Rohfett (%)	25-28
Kohlenhydrate (%)	16
Rohfaser (%)	1.9
Asche (%)	5.3
Totaler Phosphor (%)	0.9
Stickstoffgehalt (%)	7.4
Bruttoenergie (MJ/kg)	22-26
Verdauliche Energie (MJ/kg)	21.4

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Wasserparameter

Mit Ausnahme der Trübung, die sich aufgrund des experimentellen Designs signifikant ($P < 0,01$) zwischen dem Kontroll- und Belastungskreislauf unterschied, gab es bei den Wasserparametern keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen den beiden Systemen (Tabelle 5). Auch blieben alle Parameter deutlich unter den für Regenbogenforellen empfohlenen Grenzwerten.

Tabelle 5: Wasserparameter (Mittelwert \pm StAbw.; NO₃-N = Maximalwert) des Kontroll- und Belastungskreislaufsystems mit Grenzwerten nach Timmons und Ebeling (2010).

	Grenzwert	Kontrolle	Belastung	Statistische Signifikanz
pH	6,5 - 8,5	7,38 \pm 0,15	7,39 \pm 0,14	n.s.
Temperatur (°C)	< 16	14,1 \pm 0,3	14,2 \pm 0,3	n.s.
O ₂ (mg/L)	> 6	11,0 \pm 0,8	10,8 \pm 1,1	n.s.
CO ₂ (mg/L)	< 20	14,3 \pm 0,5	15,0 \pm 1,0	n.s.
NH ₄ -N (mg/L)	< 1	0,468 \pm 0,083	0,507 \pm 0,090	n.s.
NO ₂ -N (mg/L)	< 1	0,131 \pm 0,029	0,123 \pm 0,026	n.s.
max. NO ₃ -N (mg/L)	< 400	220	192	/
Ø-Wasserverbrauch (L/Tag)	/	228,6	223,2	n.s.
Trübung (NTU)	/	2,2 \pm 0,3	14,5 \pm 2,3	$P < 0,01$

*NTU = Nephelometrischer Trübungswert

6.2.2 Leistungsparameter der Fische

Insgesamt zeigten die Fische in beiden Kreislaufsystemen eine sehr gute Wachstumsleistung und wiesen bezüglich Überlebensrate, Endgewicht, Futterquotient, spezifische Wachstumsrate oder temperaturbereinigter Wachstumskoeffizient (TGC) keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) auf. Der einzige Unterschied, der zwischen den Fischen aus Kontroll- und Belastungskreislauf zu beobachten war, war das Fressverhalten: die Fische aus dem Belastungskreislauf zeigten ein deutlich ruhigeres und weniger aggressives Fressverhalten als die Fische aus dem Kontrollkreislauf. Insgesamt fraßen die Fische in beiden Kreisläufen jedoch die gleiche Menge an Futter, so dass Wachstum und Endgewicht durch das unterschiedliche Fressverhalten nicht beeinflusst wurden.

Tabelle 6: Überlebensrate, Endgewicht, Futterquotient (FQ), spezifische Wachstumsrate (SWR) und temperaturbereinigter Wachstumskoeffizient (TGC) der Fische im Kontroll- und Belastungskreislauf (MW ± StAbw.).

	Kontrolle	Belastung	Statistische Signifikanz
Überlebensrate (%)	99,68	99,16	n.s.
Endgewicht (g)	299,4 ± 64.9	299,2 ± 67.1	n.s.
FQ	0,88 ± 0,02	0,89 ± 0,02	n.s.
SWR (%/Tag)	1,084 ± 0,017	1,085 ± 0,018	n.s.
TGC	1,44 ± 0,02	1,43 ± 0,3	n.s.

6.2.3 Partikel-Analyse

Die Partikel-Konzentration (TSS-Konzentration) unterschied sich während der vier Wochen signifikant ($P < 0,001$) zwischen Kontroll- und Belastungskreislauf. Während die Partikel-Konzentration im Kontrollkreislauf im Untersuchungszeitraum um die 5 mg/L betrug, stieg sie im Belastungskreislauf von ca. 4 mg/L auf über 30 mg/L an (Abbildung 19). Ab Tag 11 überschritt die Partikel-Konzentration im Belastungskreislauf die 25 mg/L-Grenze. Der Unterschied in der Partikel-Konzentration zwischen Kontroll- und Belastungskreislauf war ab diesem Zeitpunkt niemals geringer als 21,2 mg/L. Der starke Anstieg der TSS-Konzentration ab Tag 9 wurde durch das erhöhte Einleiten von Trommelfilter-Spülwasser erreicht.

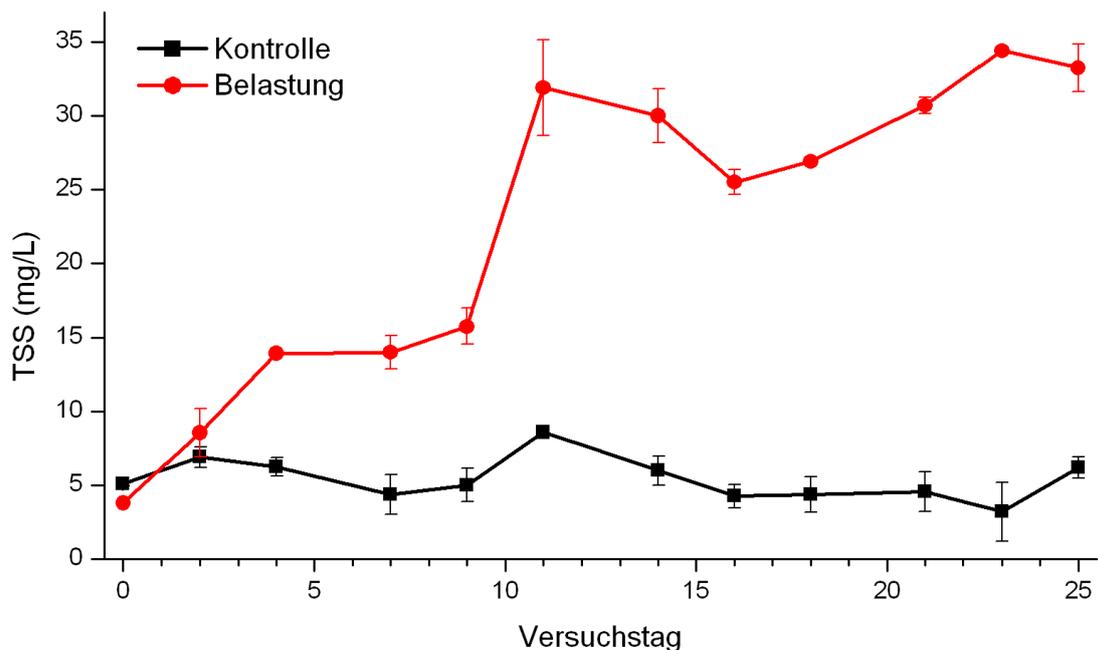


Abbildung 19: Entwicklung der Partikel-Konzentration (Mittelwert ± StAbw) im Kontroll- und Belastungskreislauf während des Untersuchungszeitraums. Probenahme: früher Morgen vor der Fütterung.

Die Abbildung 20 zeigt die absolute Häufigkeit der Partikel-Klassen im Kontroll- und Belastungskreislauf in Woche 4 der Untersuchung. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zwischen den beiden Systemen. Die Gesamtanzahl an Partikeln pro Liter war im Belastungskreislauf im Durchschnitt zweimal so hoch wie im Kontrollkreislauf. Vor allem die Anzahl an Partikeln zwischen 6 und 20 μm war im Belastungskreislauf 3,4 bis 4,6-fach höher als im Kontrollkreislauf. Insgesamt zeigte sich in beiden Kreisläufen eine Anreicherung von Feinstpartikeln, so dass im Kontrollkreislauf 99,1 % und im Belastungskreislauf 98,7 % der Partikel kleiner als 15 μm waren.

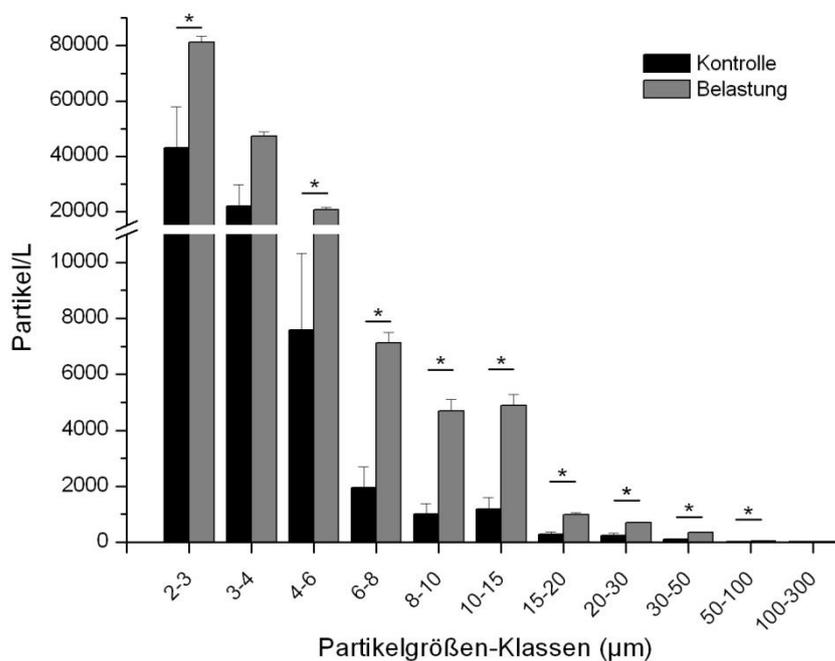


Abbildung 20: Absolute Häufigkeiten der Partikelgrößen-Klassen (MW \pm STFehler) im Kontroll- (n = 3) und Belastungskreislauf (n = 4). *zeigt signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen. Bitte die Achsenunterbrechung der Y-Achse beachten.

6.2.4 Parameter Fischgesundheit

Kiemen-Histologie

In Abbildung 21 sind der Normalzustand einer Kieme und beobachtete pathologische Veränderungen dargestellt. Insgesamt wurden während der Untersuchung vermehrt Verdickungen des Epithels, Vakuolisierungen und zelluläre Ödeme festgestellt, jedoch keine schweren histologischen Veränderungen beobachtet (Abbildung 22). In manchen Fällen war die Verdickung des Epithels nur auf die Spitzen der Sekundärlamellen beschränkt und wurde daher als „keulige Verdickung der Sekundärlamellenspitzen“ separat erfasst. Das Ablösen von Kiemenepithel, das Verschmelzen von Kiemenlamellen und das Eindringen von

mononukleären Zellen in die Sekundärlamellen wurde nur an vereinzelt Stellen beobachtet und daher bei der weiteren Auswertung nicht weiter berücksichtigt, da ein vereinzelt Auftreten von diesen histologischen Veränderungen nicht pathologisch ist.

Die Dicke des Kiemenepithels (Tabelle 7) unterschied sich sowohl zu Beginn als auch am Ende des Versuchs nicht signifikant ($P > 0,05$) zwischen den Gruppen. Auch hinsichtlich des Vorkommens von zellulären Ödemen oder keuligen Verdickungen der Sekundärlamellenspitzen (Abbildung 22) lagen sowohl zu Beginn als auch am Ende des Versuchs keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) vor. Die Prävalenz und Intensität von Epithel-Verdickung unterschied sich zwischen Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf zu Beginn der Untersuchung nicht signifikant ($P > 0,05$), jedoch war das Vorkommen von Epithel-Verdickungen am Ende des Versuchs bei Fischen des Kontrollkreislaufs signifikant höher ($P < 0,05$). Insgesamt fielen die histologischen Veränderungen bei Fischen des Belastungskreislaufs im Vergleich zum Kontrollkreislauf weniger stark aus.

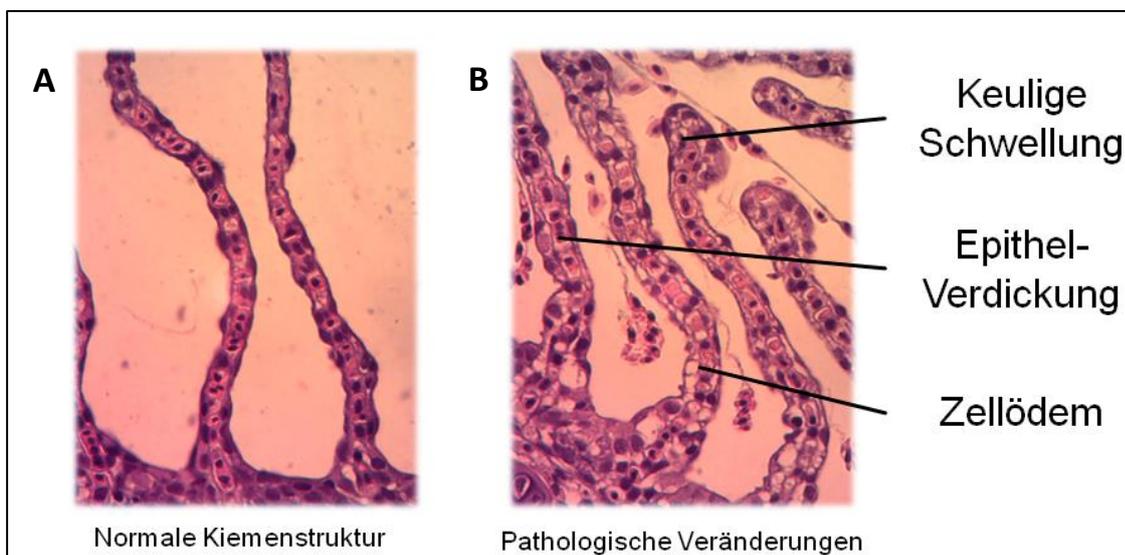


Abbildung 21: (A) Normale Kiemenstruktur und (B) pathologische Veränderungen der Kiemenstruktur.

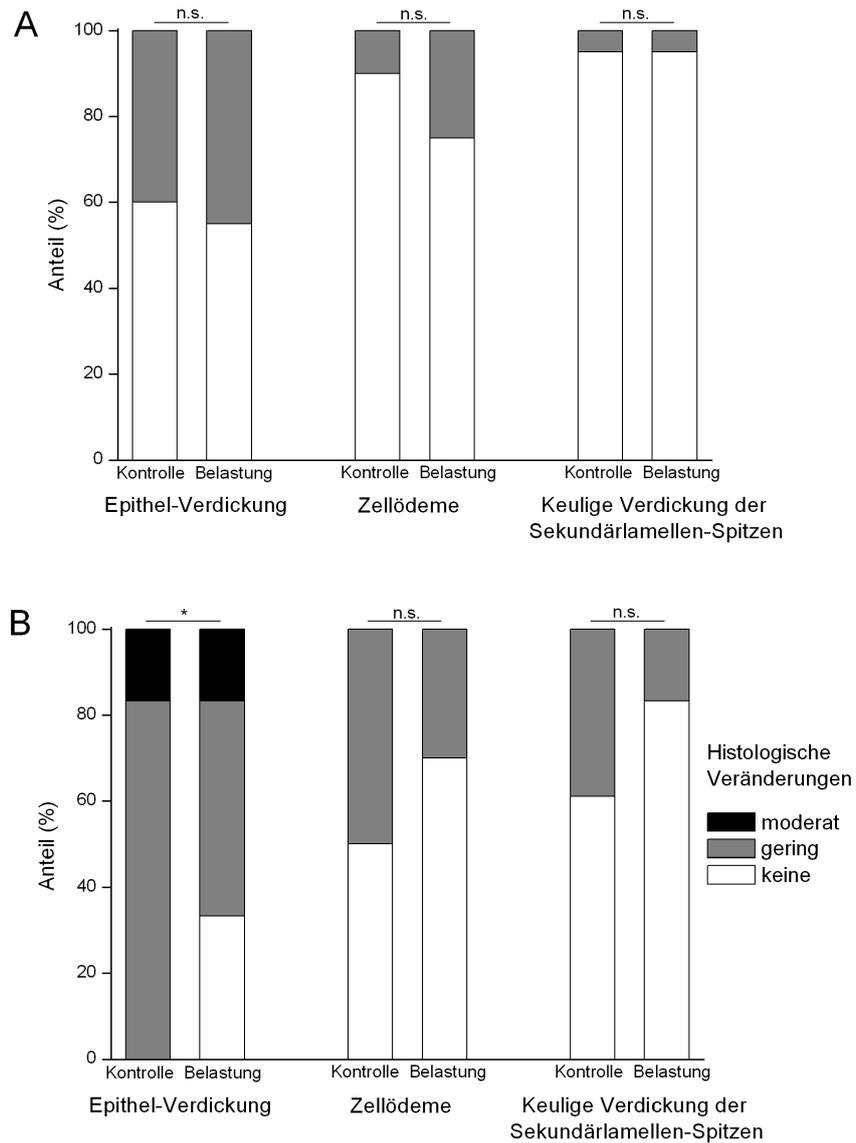


Abbildung 22: Histologische Veränderung der Kiemenstrukturen von Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf zu Beginn (A) und am Ende (B) des Versuchszeitraums.

Tabelle 7: Dicke des Kiemen-Epithels (Mittelwert ± StAbw.).

	Kontrolle (n = 20)	Belastung (n = 20)	Statistische Signifikanz
Start	4,53 ± 1,28 µm	4,31 ± 1,47 µm	n.s.
Ende	4,23 ± 0,82 µm	4,06 ± 1,17 µm	n.s.

Flossenzustand

Der Zustand der Flossen war zu Beginn des Versuchs relativ schlecht (Abbildung 23), jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen den beiden Gruppen. Am Ende des Versuchs zeigten sich bei der rechten und linken Brustflosse wiederum keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf. Die Rückenflossen von Fischen aus dem Kontrollkreislauf wiesen im Vergleich zu Fischen aus dem Belastungskreislauf jedoch einen signifikant schlechteren Zustand auf ($P < 0,05$). Der Flossenindex, also das Verhältnis der Flossenlänge zur Totallänge der Fische, zeigte zu Beginn des Experiments keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen den Fischen aus beiden Kreisläufen (Tabelle 8). Am Ende des Versuchs unterschieden sich die Ergebnisse bezüglich linker und rechter Brustflosse nicht signifikant zwischen den beiden Kreisläufen ($P > 0,05$), jedoch ergab der Flossenindex bei der Rückenflosse einen signifikant höheren Wert ($P < 0,01$) bei Fischen aus dem Belastungskreislauf. Insgesamt verbesserte sich der Flossenzustand in beiden Kreislaufsystemen im Laufe des Versuchszeitraums, mit einer Tendenz, dass die Flossenerosion im Belastungskreislauf schwächer ausfiel als im Kontrollkreislauf.

Tabelle 8: Flossenindex (Mittelwert \pm StAbw) nach Kindschi (1987).

		Kontrolle (n = 20)	Belastung (n = 20)	Statistische Signifikanz
Start	Rückenflosse	5,50 \pm 1,07	5,73 \pm 1,14	n.s.
	Rechte Brustflosse	7,83 \pm 1,14	7,03 \pm 1,55	n.s.
	Linke Brustflosse	7,30 \pm 1,62	6,99 \pm 1,89	n.s.
	Schwanzflosse	9,09 \pm 1,12	9,06 \pm 1,34	n.s.
Ende	Rückenflosse	7,59 \pm 0,98	8,43 \pm 0,87	$P < 0,01$
	Rechte Brustflosse	8,72 \pm 2,04	8,47 \pm 2,19	n.s.
	Linke Brustflosse	9,12 \pm 1,03	9,59 \pm 1,41	n.s.
	Schwanzflosse	9,86 \pm 0,69	10,14 \pm 0,69	n.s.

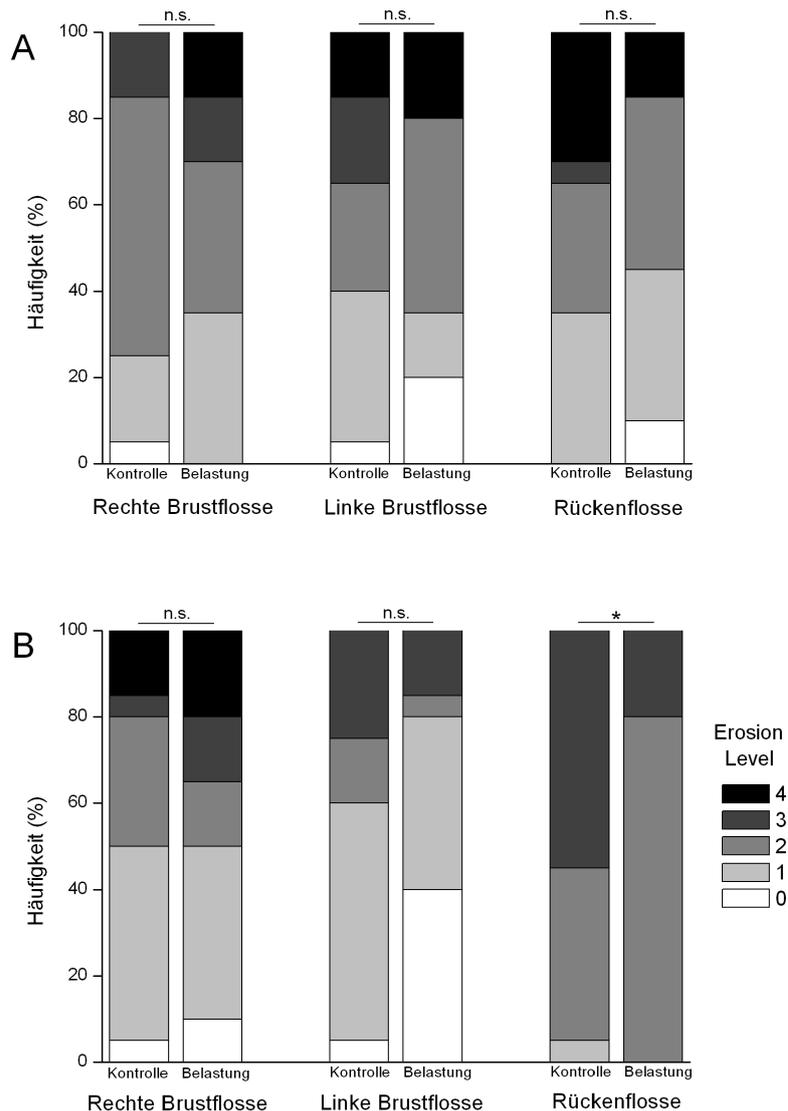


Abbildung 23: Häufigkeiten (%) der Flossenerosionslevel nach Person-Le Ruyet et al. (2007) (A) zu Beginn und (B) am Ende des Untersuchungszeitraums. Es wurden pro Probenahme jeweils 20 Regenbogenforellen untersucht. * zeigt einen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen.

Hitzeschockprotein 70 und Plasmacortisol

Bei der Hitzeschockprotein 70-Konzentration (Abbildung 24) in den Geweben Kieme, Leber, Kopfniere und Haut ergaben sich zwischen den beiden Kreislaufsystemen keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$). Die Konzentration an HSP70 war in der Kopfniere am niedrigsten, hingegen in der Leber deutlich höher als bei den restlichen Gewebearten. Auch bei der Plasmacortisol-Konzentration zeigten sich am Ende des Versuchszeitraums keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf (Abbildung 24).

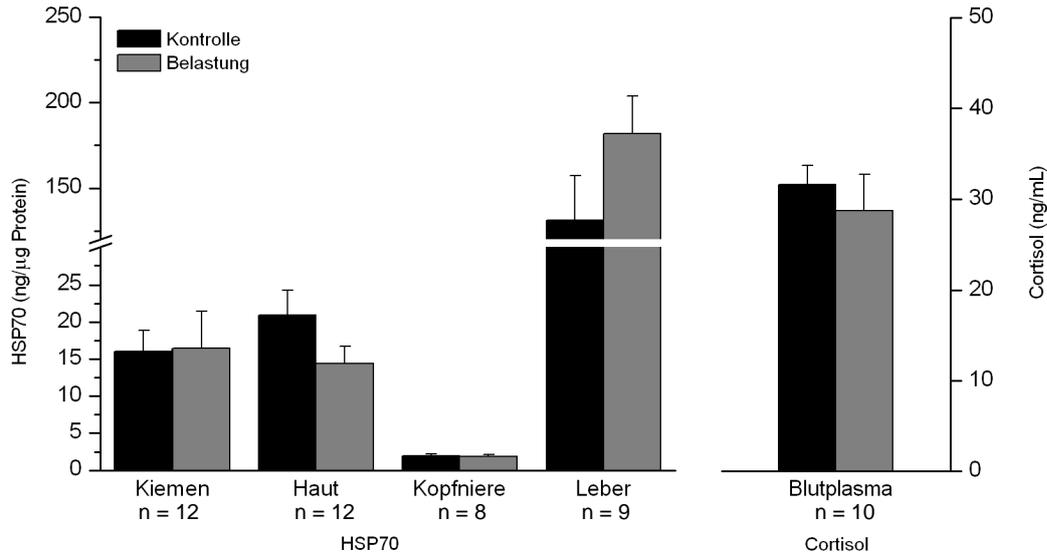


Abbildung 24: Hsp70-Konzentration (Mittelwert \pm StFehler) in der Haut, Kopfniere, Kiemen und Leber und die Plasmacortisol-Konzentration der Regenbogenforellen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf. Es wurden keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen den Gruppen gefunden. Bitte die Achsenunterbrechung der Y-Achse beachten.

Hämatologie

Insgesamt waren alle hämatologischen Parameter (Tabelle 9) zu Beginn und am Ende des Versuchszeitraum im Normalbereich und wiesen keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf auf. Das Differentialblutbild war deutlich von Lymphozyten dominiert und es konnte keine erhöhte Anzahl von Granulozyten oder Monozyten festgestellt werden.

Tabelle 9: Hämatologische Parameter der Regenbogenforellen, jeweils zu Beginn und am Ende des Versuchs bestimmt.

	n	Start		n	Ende	
		Kontrolle	Belastung		Kontrolle	Belastung
Lymphozyten (%)	18 ¹	96,6 \pm 1,7	96,5 \pm 2,5	20	95,5 \pm 2,0	95,5 \pm 2,2
Granulozyten (%)	18 ¹	2,6 \pm 1,6	3,0 \pm 2,3	20	3,1 \pm 1,8	2,8 \pm 1,9
Monozyten (%)	18 ¹	0,8 \pm 0,7	0,5 \pm 0,5	20	1,5 \pm 0,9	1,7 \pm 1,0
Erythrozyten ($10^6/\mu\text{L}$ Blut)	20	1,11 \pm 0,10	1,12 \pm 0,16	20	0,96 \pm 0,13	0,94 \pm 0,09
Hämatokrit (%)	20	36,0 \pm 3,1	35,4 \pm 5,2	20	31,8 \pm 2,8	31,1 \pm 2,5
Leukokrit (%)	20	1,1 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3	20	1,1 \pm 0,1	1,1 \pm 0,2
Hämoglobin (g/dL)	20	10,4 \pm 1,0	10,0 \pm 1,3	19 ²	9,9 \pm 0,8	10,1 \pm 1,0
MCH (pg)	20	93,7 \pm 9,8	89,0 \pm 5,0	19 ²	103,3 \pm 11,8	106,6 \pm 10,4
MCV (fL)	20	324,7 \pm 22,8	315,6 \pm 19,8	20	333,4 \pm 34,8	332,6 \pm 29,6
MCHC (g/dL)	20	28,9 \pm 2,9	28,3 \pm 1,9	19 ²	31,0 \pm 2,0	32,1 \pm 2,6

MCH = mittlerer Hämoglobin-Gehalt eines einzelnen Erythrozyten.

MCV = mittleres Volumen eines einzelnen Erythrozyten.

MCHC = mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration.

Es wurden zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) festgestellt.

¹Jeweils zwei fehlende Werte aufgrund von nicht auswertbaren Blutaussstrichen.

²Jeweils ein fehlender Wert aufgrund von Koagulation der Blutprobe.

6.3 Diskussion

Die in diesem Versuch erlangten Ergebnisse geben einen ersten Überblick über die Auswirkungen von Schwebstoffbelastung auf die Fischgesundheit in Kreislaufanlagen. Die Entkopplung der Partikelbelastung von potentiell überlagernden Wasserparametern war während des gesamten Versuchs gewährleistet, so dass erstmalig eine alleinige Beurteilung der Auswirkungen von Partikel auf die Fischgesundheit möglich war. Die Partikelkonzentration überschritt im Belastungskreislauf ab dem 10. Tag den für Salmoniden empfohlenen Grenzwert von 25 mg/L (Alabaster and Lloyd, 1982; Timmons and Ebeling, 2010). Auch der Anteil der Feinstpartikel, die als besonders schädlich für die Fischgesundheit eingestuft wurden (Chapman et al., 1987; Chen and Malone, 1991), machten in beiden Kreisläufen mehr als 99 % der Partikel aus, bei gleichzeitig deutlich höheren Partikelkonzentrationen im Belastungskreislauf.

Insgesamt deuten alle Ergebnisse dieses Versuchs darauf hin, dass – zumindest für die untersuchte kurze Expositionsdauer von vier Wochen – Partikel bis zu einer Konzentration von 25 mg/L in Kreislaufanlagen keine negativen Auswirkungen auf die Physiologie der Fische haben. Damit würde die bisherige wissenschaftliche Einschätzung, dass sich Schwebstoffe in Kreislaufanlagen negativ auf die Fischgesundheit auswirken, nicht zutreffen. Es wird deutlich, wie wichtig die vollständige Entkopplung der Partikelbelastung von anderen möglicherweise überlagernden Wasserparametern bei Experimenten ist. Denn nur so war es erstmalig möglich, die tatsächliche Auswirkung von erhöhter Partikelbelastung auf Regenbogenforellen zu untersuchen und zu bewerten.

Erstaunlich war, dass in Bezug auf den Flossenzustand und die histologischen Veränderungen der Kiemen die Regenbogenforellen aus dem Belastungskreislauf am Ende des Versuchs sogar z.T. einen besseren Zustand aufwiesen als Fische aus dem Kontrollkreislauf. Das lässt darauf schließen, dass die Haltungsbedingungen insgesamt trotz der hohen Partikelbelastung eher vorteilhaft als nachteilig waren.

Somit sprechen die Ergebnisse dieses Versuchs dafür, dass zumindest eine kurzfristig erhöhte Partikelfracht aufgrund einer Erhöhung von Besatzdichten in Kreislaufanlagen als nicht bedenklich einzustufen ist, wenn Grenzwerte der übrigen Fisch-relevanten Wasserparameter nicht überschritten werden. Durch die kurze Expositionsdauer konnten

jedoch mögliche chronische Langzeitwirkungen der Partikelbelastung nicht untersucht werden. Dies erfolgte im folgenden Langzeit-Versuch.

7 Experiment 3: Langzeit-Exposition bei einer Partikelkonzentration von über 30 mg/L

7.1 Versuchsdurchführung

Nachdem bei der Kurzzeit-Exposition bei einer Partikelkonzentration von über 25 mg/L keine negativen Auswirkungen der Schwebstoffbelastung auf die Physiologie der Regenbogenforellen festgestellt werden konnten, wurde in diesem Versuch die Dauer und die Konzentration der Schwebstoffbelastung noch einmal gesteigert, um auch mögliche chronische Effekte der Partikelbelastung zu erfassen. So wurden die Regenbogenforellen über eine Versuchsdauer von 18 Wochen, also einen kompletten Mastzeitraum, im Belastungskreislauf bei einer Partikelkonzentration von deutlich über 30 mg/L gehalten, während der Kontrollkreislauf unter Normalbedingungen betrieben wurde. Zusätzlich wurde auch noch die bakterielle Belastung sowohl des Anlagenwassers als auch der Kiemen untersucht.

Auch bei diesem Versuch war die wichtigste Voraussetzung, dass die Schwebstoffbelastung von anderen potentiell überlagernden Wasserparametern entkoppelt wurde und somit eine alleinige Betrachtung der Auswirkungen von Schwebstoffbelastung vorgenommen werden konnte. Um eine präzise Kontrolle der Ammoniumwerte zu gewährleisten, wurde in der Versuchsanlage ein Automat zur Messung der $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration (AMTAX, Hach) installiert. Dadurch war es möglich die $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration jeweils stündlich abwechselnd in den beiden Kreisläufen zu messen. In Abbildung 25 ist beispielhaft der Verlauf der $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration in Woche 14 dargestellt.

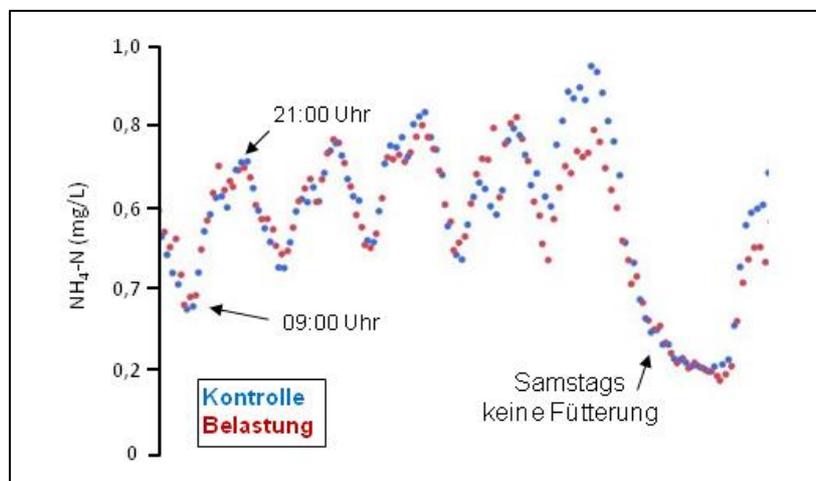


Abbildung 25: Der Verlauf der $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration im Kontroll- und Belastungskreislauf in Woche 14.

Pro Kreislaufsystem wurden ca. 600 Regenbogenforellen (rein weiblich, Fischzucht Störk) eingesetzt und bis zu einer maximalen Besatzdichte von $68,4 \pm 2,6 \text{ kg m}^{-3}$ (Kontrolle) bzw. $65,2 \pm 2,3 \text{ kg m}^{-3}$ (Belastung) gehalten. Das mittlere Gewicht der Regenbogenforellen betrug zu Beginn des Experiments $86,8 \pm 12,0 \text{ g}$ (Kontrolle) bzw. $86,5 \pm 10,7 \text{ g}$ (Belastung). Die Fische wurden an sechs Tagen in der Woche (Sonntag-Freitag) gefüttert. Die restriktive Futtergabe erfolgte jeweils am Morgen und am Nachmittag per Handfütterung. Als Futter wurde für beide Kreisläufe EFICO Enviro 921 (Biomar, Dänemark) verwendet. Zu Beginn des Versuchs betrug die Futtermenge 1,6 % des Körpergewichts und wurde im Laufe des Experiments auf 1,2 % verringert.

Die Probenahmen erfolgten bei diesem Versuch zu Beginn des Experiments, in Woche 10 und in Woche 17. Im Anschluss an die letzte Probenahme wurde dem Futter Yttriumoxid zugesetzt, um die Verdaulichkeit des Futters zwischen beiden Kreisläufen vergleichen zu können.

7.2 Ergebnisse

7.2.1 Wasserparameter

Die Trübung unterschied sich aufgrund des experimentellen Designs signifikant ($P < 0,001$) zwischen dem Kontroll- und Belastungskreislauf. Auch bei der O_2 -Konzentration und der Wassertemperatur ergaben sich signifikante Unterschiede ($P < 0,001$), jedoch sind diese Unterschiede minimal und biologisch nicht relevant (Tabelle 10). Alle anderen Wasserparameter unterschieden sich nicht signifikant ($P > 0,05$) zwischen den beiden Kreisläufen. Auch wurden kritische Grenzwerte für Regenbogenforellen zu keiner Zeit des Experiments überschritten. Im Unterschied zu den vorherigen Versuchen wurde ab diesem Versuch die NH_4 -N-Konzentration kontinuierlich durch einen Automaten gemessen.

Tabelle 10: Wasserparameter (Mittelwert \pm StAbw.; NO_3 -N = Maximalwert) des Kontroll- und Belastungskreislaufsystems mit Grenzwerten nach Timmons und Ebeling (2010).

	Grenzwert	Kontrolle	Belastung	Statistische Signifikanz
pH	6,5 - 8,5	7,38 \pm 0,16	7,40 \pm 0,13	n.s.
O_2 (mg/L)	> 6	10,5 \pm 0,5*	10,6 \pm 0,5*	$P < 0,001$
Wassertemperatur ($^{\circ}C$)	< 16	14,3 \pm 0,1*	14,1 \pm 0,2*	$P < 0,001$
NH_4 -N (mg/L)	< 1	0,473 \pm 0,142	0,463 \pm 0,125	n.s.
NO_2 -N (mg/L)	< 1	0,126 \pm 0,057	0,134 \pm 0,059	n.s.
NO_3 -N (mg/L) (max.)	< 400	312	300	/
CO_2 (mg/L)	< 20	14,7 \pm 3,6	15,0 \pm 3,3	n.s.
Wasserverbrauch (L/Tag)	/	256,7 \pm 79,9	251,0 \pm 126,2	n.s.
Trübung (NTU)	/	2,2 \pm 0,6	10,0 \pm 4,4	$P < 0,001$

*NTU = Nephelometrischer Trübungswert

7.2.2 Leistungsparameter der Fische

Insgesamt zeigten die Fische in beiden Kreislaufsystemen eine sehr gute Wachstumsleistung. Es wurden trotz der erhöhten Partikelbelastung im Belastungskreislauf keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) bezüglich Überlebensrate, Endgewicht, Futterquotient, spezifische Wachstumsrate oder temperaturbereinigter Wachstumskoeffizient zwischen den beiden Gruppen festgestellt. Auch hinsichtlich der Verdaulichkeit trat kein signifikanter Unterschied ($P > 0,05$) auf. Wie schon im Kurzzeitversuch beobachtet, zeigten die Fische im Kontrollkreislauf ein deutlich aktiveres und aggressiveres Fressverhalten als die Fische im Belastungskreislauf. Auch wurde eine deutliche Verzögerung bis zur Futteraufnahme bei

Fischen des Belastungskreislaufs festgestellt. Dies hatte aber keinen Einfluss auf das Wachstum und das Endgewicht der Fische, da im ganzen Versuch per Hand gefüttert wurde und so gewährleistet wurde, dass die Pellets von den Fischen auch wirklich gefressen wurden.

Tabelle 11: Endgewicht, Überlebensrate, Futterquotient (FQ), spezifische Wachstumsrate (SWR), temperaturbereinigter Wachstumskoeffizient (TGC) und Verdaulichkeit (Trockenmasse) der Fische im Kontroll- und Belastungskreislauf (MW ± StAbw.).

	Kontrolle	Belastung	Statistische Signifikanz
Endgewicht (g)	448,9 ± 104,5	450,6 ± 98,4	n.s.
Überlebensrate (%)	94,9 ± 2,1	90,8 ± 4,9	n.s.
FQ	0,92 ± 0,02	0,91 ± 0,02	n.s.
SWR (%/Tag)	1,31 ± 0,02	1,32 ± 0,02	n.s.
TGC	1,81 ± 0,03	1,84 ± 0,04	n.s.
Verdaulichkeit (Trockenmasse) (%)	84,5 ± 0,3	83,8 ± 0,8	n.s.

7.2.3 Partikel-Analyse

Die Partikelkonzentration unterschied sich signifikant ($P < 0,0001$) zwischen Kontroll- und Belastungskreislauf. Während die Partikelkonzentration im Kontrollkreislauf während des gesamten Versuchszeitraums meist weniger als 5 mg/L betrug, stieg die Partikelbelastung im Belastungskreislauf stark an und betrug ab der 10. Versuchswoche deutlich über 30 mg/L (Abbildung 26). Ab diesem Zeitpunkt war der Unterschied in der Partikelkonzentration zwischen den beiden Systemen nie geringer als 21 mg/L. In Abbildung 27 ist die Veränderung der Partikelkonzentration des Kontroll- und Belastungskreislaufs im Tagesverlauf in Woche 4 und 14 dargestellt. In Woche 4 ist schon ein Unterschied zwischen Kontroll- und Belastungskreislauf zu sehen. Im Tagesverlauf betrug die Partikelkonzentration im Kontrollkreislauf zwischen 4,3 und 8,6 mg/L, im Belastungskreislauf zwischen 8,6 und 19,6 mg/L. In Woche 14 unterschied sich die Partikelkonzentration zwischen den beiden Systemen deutlich und schwankte im Kontrollkreislauf zwischen 2,4 und 9,1 mg/L und im Belastungskreislauf zwischen 32,3 und 71,0 mg/L.

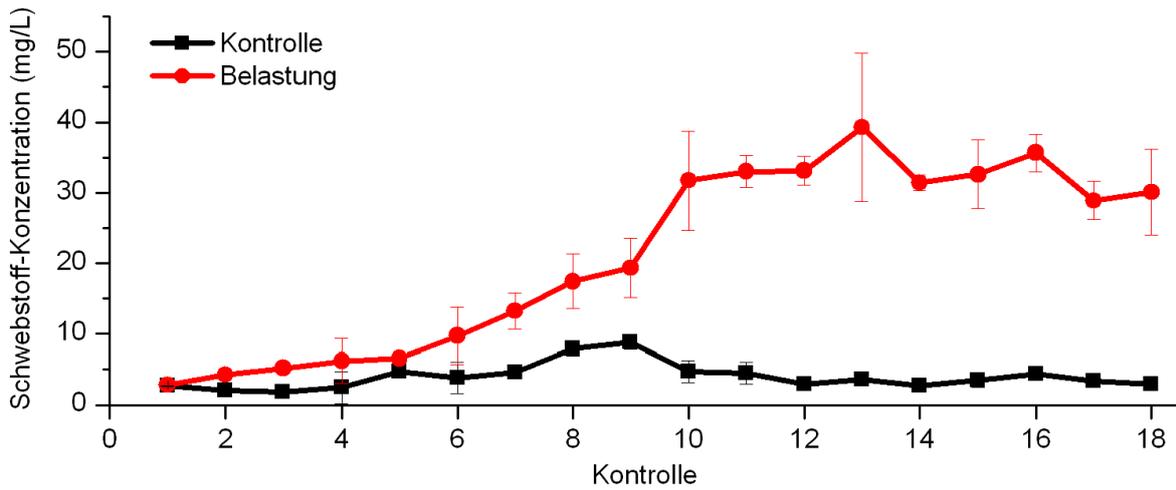


Abbildung 26: Entwicklung der Partikelkonzentration (Mittelwert \pm StAbw.) im Kontroll- und Belastungskreislauf während des Untersuchungszeitraums. Probenahme: früher Morgen vor der Fütterung.

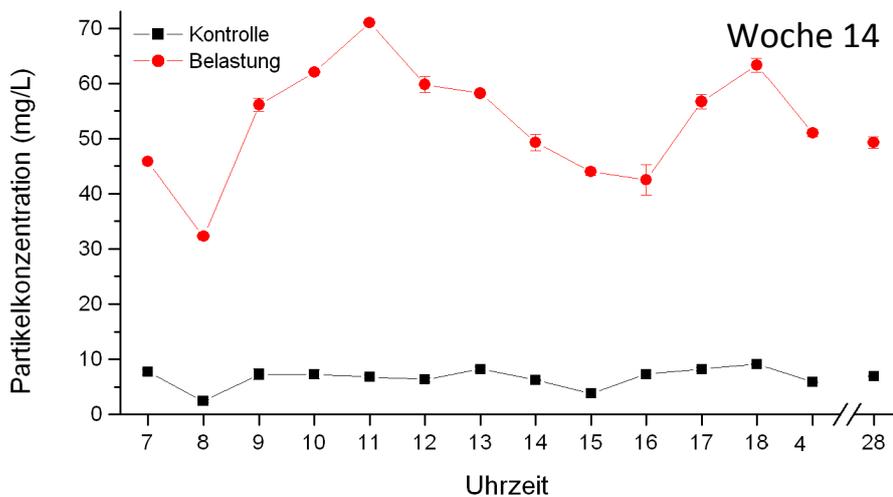
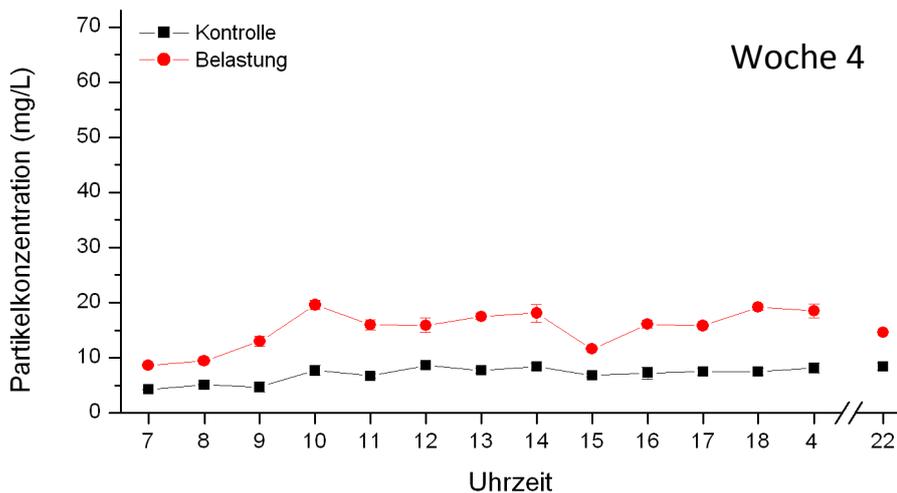


Abbildung 27: Veränderung der Partikelkonzentration des Kontroll- und Belastungskreislaufs im Tagesverlauf in Woche 4 und in Woche 14.

In Abbildung 28 sind die absoluten Häufigkeiten der Partikelgrößen-Klassen im Kontroll- und Belastungskreislauf in Versuchswoche 18 dargestellt. Insgesamt war eine sehr viel höhere Anzahl an Partikeln im Belastungskreislauf festzustellen. Alle Partikelgrößen-Klassen, außer die Größenklasse 30 – 50 μm ($P > 0,05$), unterschieden sich signifikant ($P < 0,05$) zwischen den beiden Systemen. Im Versuchszeitraum kam es in beiden Kreislaufsystemen zu einer deutlichen Anreicherung von Kleinstpartikeln, so waren im Kontrollkreislauf 98 % und im Belastungskreislauf 97 % aller Partikel kleiner als 15 μm .

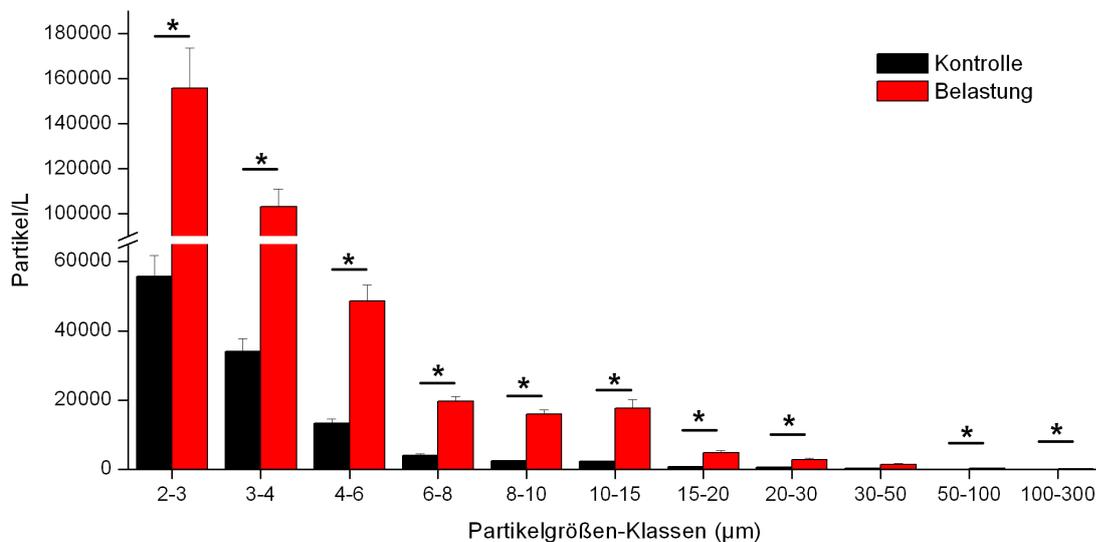


Abbildung 28: Absolute Häufigkeiten der Partikelgrößen-Klassen (MW \pm StFehler) im Kontroll- und Belastungskreislauf in Woche 18. Bitte die Achsenunterbrechung der Y-Achse beachten.

7.2.4 Parameter Fischgesundheit

Kiemen-Histologie

Zusätzlich zu den schon im vorherigen Versuch beurteilten Parametern, wurden in diesem Versuch noch die Anzahl an Becherzellen (Schleimzellen) und das Auftreten von Teleangiektasien (Blutungen an den Spitzen der Sekundärlamellen) sowie Verschmelzungen von Sekundärlamellen beurteilt (Abbildung 29). Hinsichtlich der Parameter Zellödeme, Zellinfiltration, keulige Spitzen der Sekundärlamellen, Epithelablösung, Teleangiektasien und Fusion von Sekundärlamellen (Abbildung 30) wurden sowohl zu Beginn, in der Mitte als auch am Ende des Versuchs keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf gefunden. Das Auftreten von Verdickungen des Epithels unterschied sich weder am Anfang noch am Ende des Versuchs signifikant ($P > 0,05$) zwischen den beiden Gruppen, jedoch war das Vorkommen von Epithel-Verdickungen in der

Mitte des Versuchs bei Fischen des Kontrollkreislaufs signifikant höher ($P < 0,05$). Insgesamt traten in der Mitte des Experiments die stärksten histologischen Veränderungen auf, die sich jedoch zum Ende des Versuchs wieder deutlich abgeschwächt haben.

Die Dicke des Kiemenepithels (Tabelle 12) unterschied sich an allen drei Untersuchungszeitpunkten nicht signifikant ($P > 0,05$) zwischen den Regenbogenforellen des Kontroll- und Belastungskreislaufs. Die Anzahl an Becherzellen pro Sekundärlamelle war zu Beginn und in der Mitte des Experiments nicht signifikant unterschiedlich ($P > 0,05$), jedoch wurden am Ende des Versuchs signifikant mehr Becherzellen pro Sekundärlamelle ($P < 0,01$) bei Fischen aus dem Belastungskreislauf im Vergleich zu Fischen aus dem Kontrollkreislauf festgestellt.

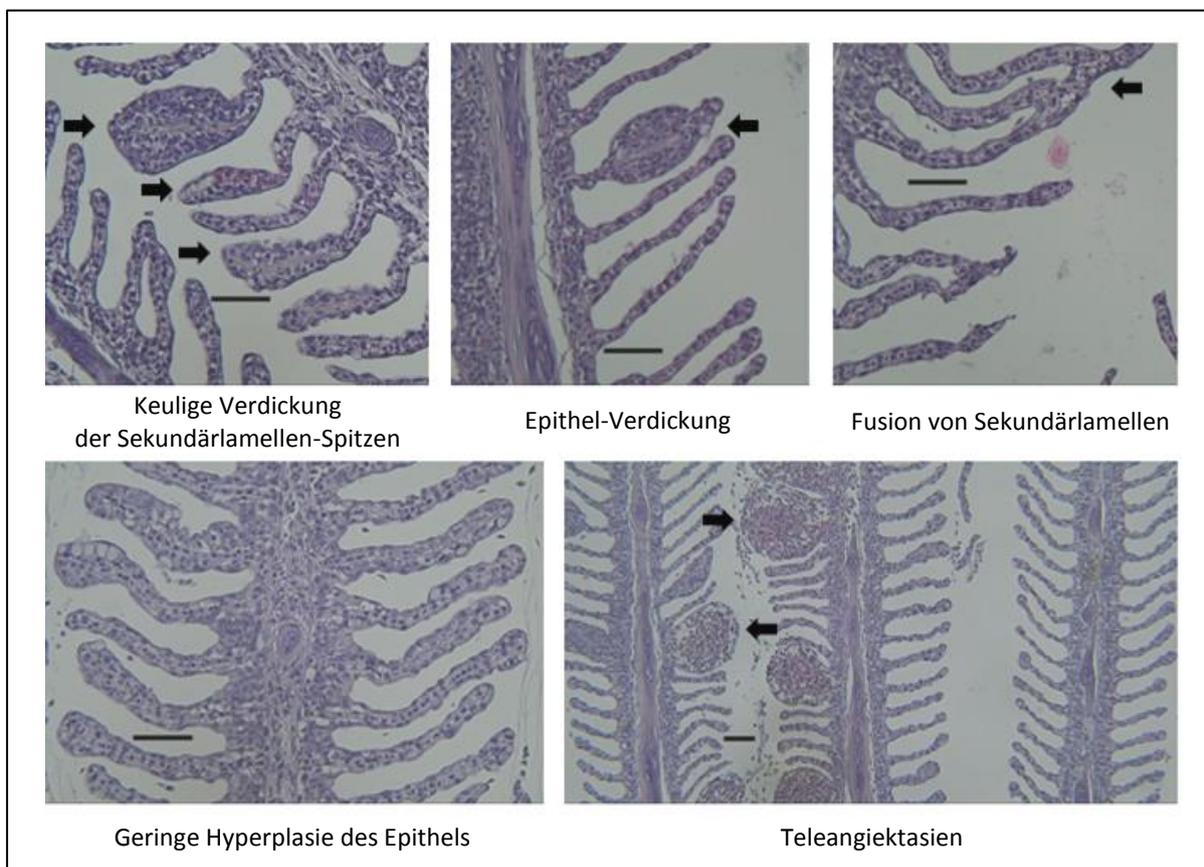


Abbildung 29: Histologische Veränderungen der Kiemenstrukturen. Maßstabsbalken = 50 μm .

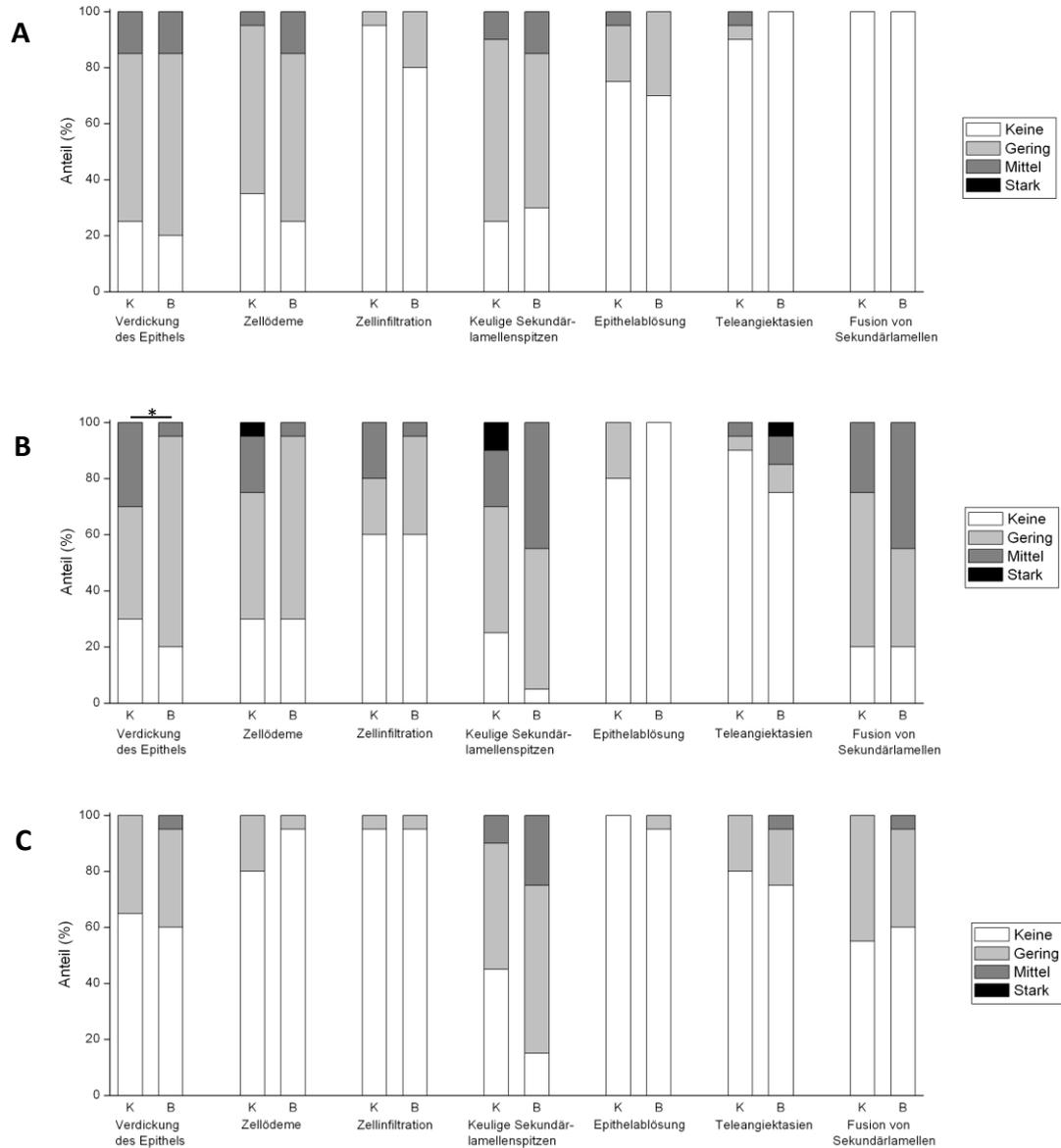


Abbildung 30: Histologische Veränderungen der Kiemen gefunden zu Beginn (A), in der Mitte (B) und am Ende (C) des Versuchszeitraums. Es wurden pro Zeitpunkt jeweils 20 Regenbogenforellen pro Kreislaufsystem untersucht. K = Kontrollkreislauf; B = Belastungskreislauf. * = signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 12: Epitheldicke und Anzahl an Becherzellen pro Sekundärlamelle (Mittelwert \pm StAbw.) von Regenbogenforellen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf. Es wurden pro Zeitpunkt jeweils 20 Fische pro Kreislauf untersucht.

Parameter	Zeitpunkt	Kontrolle	Belastung	Statistische Signifikanz
Epitheldicke (μm)	Start	$6,0 \pm 1,6$	$5,7 \pm 1,3$	n.s.
	Mitte	$5,9 \pm 2,0$	$5,9 \pm 1,6$	n.s.
	Ende	$4,7 \pm 1,8$	$4,6 \pm 1,5$	n.s.
Anzahl (n) an Becherzellen pro Sekundärlamelle	Start	$0,8 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,5$	n.s.
	Mitte	$1,3 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,5$	n.s.
	Ende	$1,1 \pm 0,4$	$1,9 \pm 1,1$	$P < 0,01$

Flossenzustand

Die Flossenerosion (Abbildung 31) unterschied sich am Start und in der Mitte des Experiments bei keiner der untersuchten Flossen signifikant ($P > 0,05$) zwischen den beiden Gruppen. Am Ende des Versuchs zeigten die rechten Brustflossen der Regenbogenforellen aus dem Kontrollkreislauf signifikant höhere Erosionslevel ($P < 0,05$) als die Flossen der Regenbogenforellen aus dem Belastungskreislauf. Die Flossenerosion der linken Brustflosse und der Rückenflosse zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$).

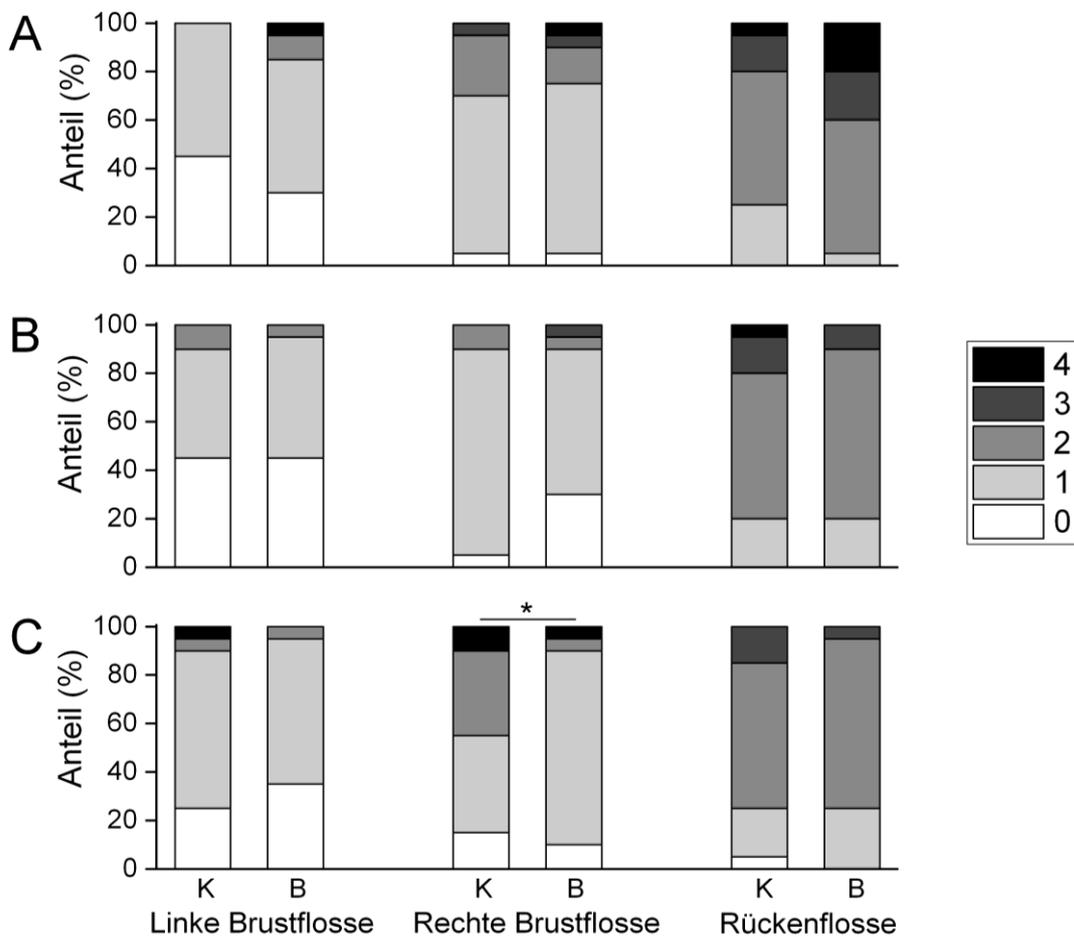


Abbildung 31: Anteile (%) der Flossen-Erosionslevel nach Person-Le Ruyet et al. (2007) zu Beginn (A), in der Mitte (B) und am Ende (C) des Versuchszeitraums. Es wurden pro Zeitpunkt jeweils 20 Regenbogenforellen pro Kreislaufsystem untersucht. K = Kontrollkreislauf; B = Belastungskreislauf. * = signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zwischen den beiden Systemen.

Der Flossenindex der rechten als auch der linken Brustflosse (Tabelle 13) wies zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung einen signifikanten Unterschied ($P > 0,05$) zwischen Fischen beider Kreisläufe auf. Der Flossenindex der Rückenflosse unterschied sich zu Beginn und am Ende des Experiments nicht signifikant ($P > 0,05$) zwischen den beiden Gruppen. In der Mitte des Versuchs war jedoch der Flossenindex der Rückenflosse der Fische aus dem Belastungskreislauf signifikant höher ($P < 0,05$) als bei den Rückenflossen der Fische aus dem Kontrollkreislauf.

Tabelle 13: Flossenindex (Mittelwert \pm StAbw) nach Kindschi (1987).

	Start		Mitte		Ende	
	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung
<i>n</i>	20	20	20	20	20	20
Rückenflosse	7,5 \pm 1,4	6,9 \pm 1,4	7,7 \pm 0,9*	8,4 \pm 0,8*	8,5 \pm 1,0	8,9 \pm 0,7
Rechte Brustflosse	10,2 \pm 1,1	10,2 \pm 0,8	10,5 \pm 0,7	10,6 \pm 0,8	9,6 \pm 1,8	10,4 \pm 1,4
Linke Brustflosse	11,1 \pm 0,5	10,8 \pm 0,9	10,9 \pm 0,8	11,1 \pm 0,7	10,3 \pm 1,4	10,9 \pm 1,0

* = signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen.

Hitzeschockprotein 70

In Abbildung 32 ist die Hsp70-Konzentration in den Geweben Haut, Kiemen, Kopfniere und Leber dargestellt. Es gab bei keiner der untersuchten Gewebearten einen signifikanten Unterschied ($P > 0,05$) zwischen Fischen aus dem Kontroll- und dem Belastungskreislauf. Die höchste Hsp70-Konzentration wurde wiederum in der Leber festgestellt.

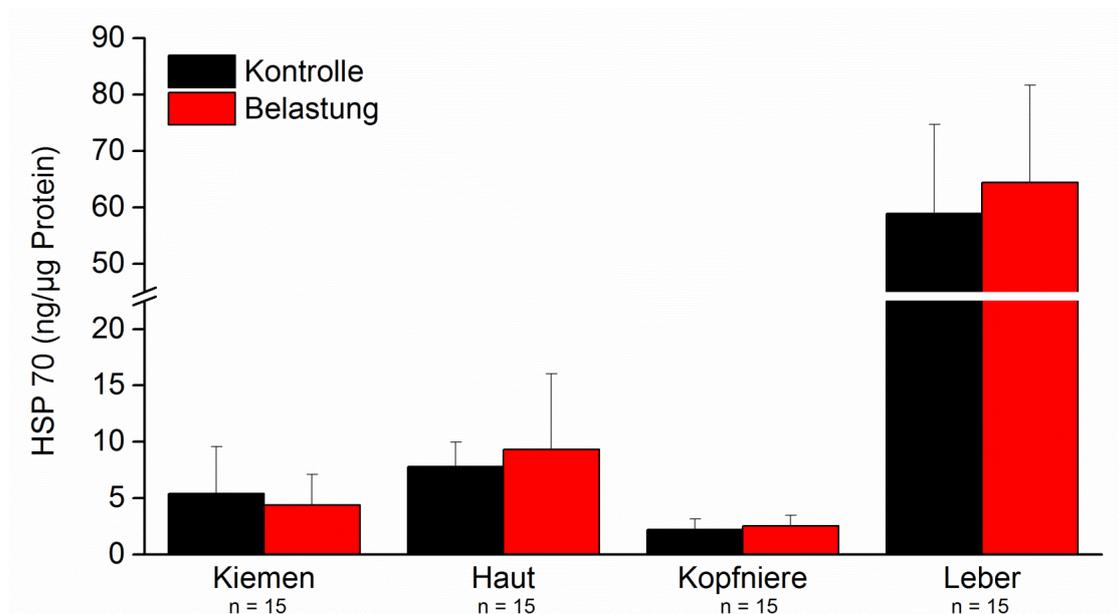


Abbildung 32: HSP70-Konzentration (Mittelwert \pm StAbw) in Kiemen, Haut, Kopfniere und Leber von Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Bitte die Achsenunterbrechung der Y-Achse beachten.

Hämatologie

In Tabelle 14 sind die hämatologischen Parameter der Regenbogenforellen zu Beginn, in der Mitte und am Ende des Versuchszeitraums dargestellt. Zu Beginn des Versuchs zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf nur beim Hämatokrit ($P < 0,05$) und dadurch auch beim MCV ($P < 0,05$). Alle anderen Parameter wiesen keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) auf.

Bei der mittleren Probenahme war beim Leukokrit ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zwischen den Fischen der beiden Kreislaufsysteme festzustellen. Sowohl die Hämoglobinkonzentration als auch der MCHC-Wert war bei Fischen des Kontrollkreislaufs signifikant höher ($P < 0,05$) als bei Fischen des Belastungskreislaufs. Des Weiteren war sowohl die Anzahl der Thrombozyten ($P < 0,05$) als auch die Anzahl der Leukozyten ($P < 0,001$) im Belastungskreislauf signifikant niedriger als im Kontrollkreislauf. Alle anderen Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$).

Bei der abschließenden Probenahme unterschied sich die relative Anzahl an Granulozyten signifikant ($P < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen. Der MCHC-Wert war signifikant höher ($P < 0,001$) bei Fischen des Belastungskreislaufs, während der MCV-Wert bei Fischen des Kontrollkreislaufs signifikant höher ($P < 0,001$) ausfiel. Alle anderen Parameter wiesen keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) auf.

Tabelle 14: Hämatologische Parameter der Regenbogenforellen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf, die zum Start, in der Mitte und am Ende des Versuchs bestimmt wurden.

	Start		Mitte		Ende	
	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung
Erythrozyten ($10^6/\mu\text{L}$)	1,07 ± 0,16	1,04 ± 0,14	1,01 ± 0,12	1,08 ± 0,18	1,00 ± 0,18	1,04 ± 0,09
Thrombozyten ($10^4/\mu\text{L}$)	1,21 ± 0,41	1,24 ± 0,37	1,21 ± 0,39*	0,97 ± 0,27*	1,61 ± 0,54	1,46 ± 0,37
Leukozyten ($10^4/\mu\text{L}$)	2,18 ± 0,71	2,09 ± 0,70	2,54 ± 0,63***	1,72 ± 0,52***	2,64 ± 0,75	2,64 ± 0,97
Lymphozyten (%)	94,3 ± 4,2	94,4 ± 4,8	94,7 ± 2,5	94,7 ± 2,5	91,8 ± 4,3	93,5 ± 5,3
Granulozyten (%)	3,9 ± 3,7	3,1 ± 2,6	4,1 ± 2,2	3,5 ± 1,6	6,2 ± 2,6*	4,7 ± 4,2*
Monozyten (%)	1,8 ± 1,8	2,5 ± 3,3	1,3 ± 0,9	1,8 ± 1,2	2,1 ± 2,9	1,9 ± 1,6
Hämatokrit	34,5 ± 3,9*	31,7 ± 3,1*	32,5 ± 3,3	33,0 ± 3,5	32,4 ± 4,3	30,7 ± 2,4
Leukokrit	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2*	0,9 ± 0,1*	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2
Glukose	40,6 ± 7,5	43,3 ± 8,4	55,6 ± 9,7	55,4 ± 12,0	60,9 ± 7,9	59,0 ± 6,7
Hämoglobin	9,8 ± 1,6	9,3 ± 1,0	9,3 ± 0,9*	10,0 ± 1,4*	9,6 ± 1,2	9,7 ± 0,8
MCH (pg)	93,4 ± 20,7	90,4 ± 14,7	92,3 ± 10,4	93,8 ± 12,6	97,8 ± 9,9	93,6 ± 7,4
MCHC (g/dL)	28,3 ± 4,6	29,2 ± 3,4	28,6 ± 2,1*	30,4 ± 2,7*	29,8 ± 1,5***	31,8 ± 1,7***
MCV (fL)	338,1 ± 41,8*	308,3 ± 32,0*	324,2 ± 38,9	308,1 ± 26,5	328,7 ± 27,8***	294,9 ± 22,9***

* = signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zwischen Kontroll- und Belastungskreislauf.

** = signifikanter Unterschied ($P < 0,01$) zwischen Kontroll- und Belastungskreislauf.

*** = signifikanter Unterschied ($P < 0,001$) zwischen Kontroll- und Belastungskreislauf.

MCH = mittlerer Hämoglobin-Gehalt eines einzelnen Erythrozyten.

MCV = mittleres Volumen eines einzelnen Erythrozyten.

MCHC = mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration.

7.2.5 Bakterielle Belastung

Koloniebildende Einheiten

Die Untersuchung von Wasserproben aus beiden Kreislaufsystemen (Abbildung 33) zeigte eine deutlich höhere bakterielle Belastung im Belastungskreislauf. Während die Unterschiede in den Fischbecken und vor der UV-Bestrahlung nicht signifikant ($P > 0,05$) ausfielen, wurden nach der UV-Bestrahlung signifikant höhere Werte ($P < 0,05$) im Belastungskreislauf festgestellt.

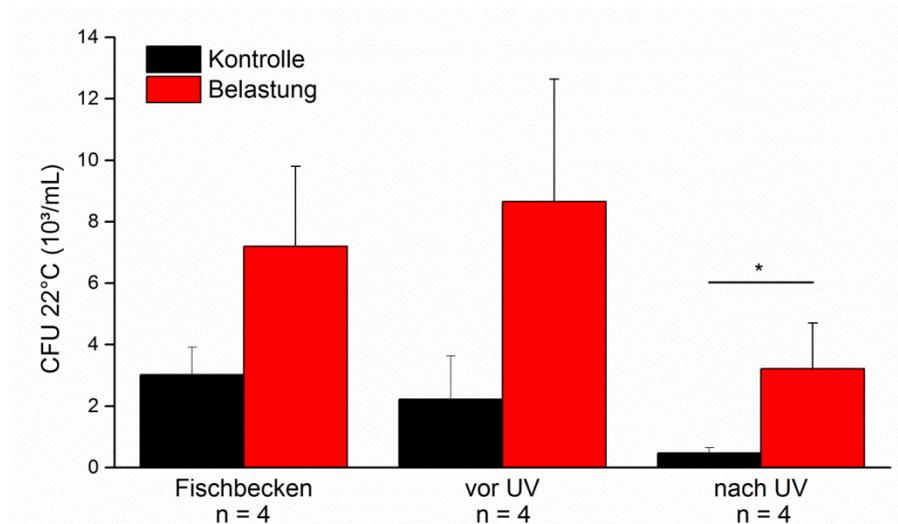


Abbildung 33: Bakterielle Belastung des Anlagenwasser (MW ± StAbw) aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf.

Bakteriologische Untersuchung durch den Fischgesundheitsdienst Aulendorf

Für die bakteriologische Untersuchung wurden am Ende des Versuchs jeweils 20 Regenbogenforellen pro Kreislauf durch den Fischgesundheitsdienst Aulendorf untersucht. Die Untersuchung der Haut ergab bei Fischen des Kontrollkreislaufs in einem Fall und bei Fischen des Belastungskreislaufs in vier Fällen eine Besiedlung mit dem fischpathogenen Bakterium *Flavobacterium columnare*. Im Kontrollkreislauf konnte auch bei einem Fisch der Ektoparasit *Trichodina sp.* nachgewiesen werden. Die Untersuchung der bakteriellen Besiedlung der Kiemen zeigte eine signifikant höhere Belastung ($P < 0,05$) bei Fischen aus dem Belastungskreislauf (Abbildung 34). Des Weiteren wurde *Flavobacterium columnare* deutlich häufiger auf Kiemen von Fischen aus dem Belastungskreislauf (30 % aller Fische) nachgewiesen, als auf den Kiemen von Fischen aus dem Kontrollkreislauf (5 % aller Fische). Die bakteriologische Untersuchung der Milz ergab bei Fischen beider Kreisläufe insgesamt beim Quetschpräparat und bei der Direktanzucht nur in Einzelfällen (Kontrolle: 1 Nachweis,

Belastung: 2 Nachweise) den vereinzelt Nachweis von Bakterien (unspezifische Mischkultur).

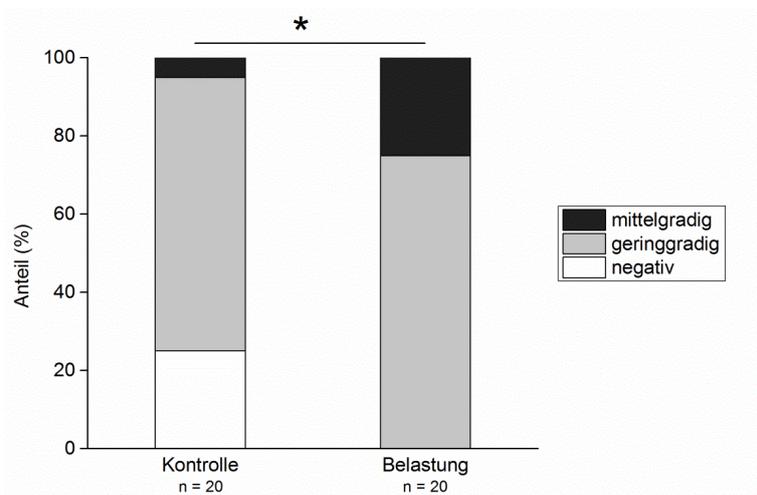


Abbildung 34: Bakterielle Belastung der Kiemen von Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf am Ende des Versuchszeitraums.

7.3 Diskussion

In der vorliegenden chronischen Exposition mit hoher TSS-Konzentration gelang die Entkopplung von potentiell überlagernden Wasserparametern, so dass eine alleinige Betrachtung der Auswirkungen von erhöhter Partikelkonzentration über einen längeren Zeitraum möglich war. Die Partikelkonzentration wurde jeweils morgens gemessen, so dass hier die minimalen Tageswerte der Partikelkonzentration erfasst wurden. Der in der Literatur (Alabaster und Lloyd, 1982; Timmons und Ebeling, 2010) genannte Grenzwert von 25 mg/L wurde ab Woche 10 kontinuierlich und deutlich überschritten. Messungen des Tagesverlaufs der Partikelkonzentration zeigen jedoch, dass dieser Grenzwert schon ab Woche 6 zumindest periodisch überschritten wurde. Im weiteren Verlauf des Experiments wurden Konzentrationsspitzen von über 70 mg/L gemessen. Diese Werte gelten landläufig als äußerst schädlich, insbesondere da es sich bei über 90 % der Partikel um Feinstpartikel handelt. Trotzdem wurden wie schon im Kurzzeitversuch auch bei dieser chronischen Exposition bei den Leistungsparametern der Fische keine signifikanten Unterschiede zwischen Fischen der beiden Kreisläufe gefunden. Es zeigte sich bei Fischen aus dem Belastungskreislauf nur eine zeitliche Verzögerung bis zur Aufnahme des Futters. Nichtsdestotrotz nahmen die Fische aus beiden Kreisläufen die gleiche Menge an Futter auf, bei Rationen die der kommerziellen Fischzucht entsprechen (Cho, 1992). Bei der Verwendung von Futterautomaten hätte die verzögerte Futterraufnahme vermutlich zu Futtermitteln geführt. Insgesamt wurden trotz erhöhter Partikelbelastung von über 70 mg/L auch bei chronischer Exposition keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum oder die Futterverwertung gefunden. Möglicherweise hätte das zögerliche Fressverhalten der Fische im Belastungskreislauf unter kommerziellen Bedingungen vermutlich zu deutlichen Futtermitteln geführt, und stellt somit eine erste Erklärung für die zitierten negativen Effekte von Partikelbelastung auf Fische dar.

Die Auswertung der histologischen Kiemenschnitte ergab keine Anhaltspunkte, dass sich die erhöhte Partikelbelastung negativ auf die Kiemenstruktur auswirkt. Im Vergleich zum Start des Versuchs zeigte sich in der Mitte des Experiments sowohl bei Fischen des Kontroll- als auch des Belastungskreislaufs eine leichte Verschlechterung der Kiemenstrukturen, die also nicht den Partikeln zuzuordnen ist. Zum Ende des Versuchs kam es dann aber wieder zu einer nahezu vollständigen Regeneration der Kiemenstrukturen, so dass ähnliche Ergebnisse

wie zum Start des Experiments bei beiden Ansätzen festgestellt wurden. Somit scheint auch das Regenerationspotenzial nicht durch die Schwebstoffe eingeschränkt zu sein. Einzig bei der Anzahl an Becherzellen pro Sekundärlamelle wurde am Ende des Versuchs ein Unterschied zwischen den Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf festgestellt. Die erhöhte Anzahl an Becherzellen bei Fischen aus dem Belastungskreislauf ist vermutlich auf eine Adaption in Form einer leicht erhöhten Schleimproduktion aufgrund der erhöhten Partikelbelastung zurückzuführen.

Der Zustand der Flossen war, auch wie schon beim Kurzzeitversuch beobachtet wurde, zwischen Fischen aus den beiden Kreislaufsystemen vergleichbar. Am Ende des Versuchs war die Flossenerosion der rechten Brustflosse sogar bei Fischen aus dem Kontrollkreislauf stärker ausgeprägt. Da die Strömungsrichtung in den Becken im Uhrzeigersinn verläuft, sind die rechten Brustflossen zur Mitte der Becken hin exponiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass aufgrund der erhöhten Trübung im Belastungskreislauf die Aktivität der Fische untereinander nicht so hoch ist wie im Kontrollkreislauf. Dies könnte den besseren Zustand der rechten Brustflossen im Belastungskreislauf aufgrund reduzierter Berührungen zwischen den Fischen erklären.

Hinsichtlich der Hsp70-Konzentration wurden in den untersuchten Gewebearten, wie auch schon im Kurzzeitversuch, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fischen der beiden Kreisläufe gefunden. Das deutet darauf hin, dass selbst eine chronische Partikelbelastung von bis zu 70 mg/L keinen erhöhten Stresszustand bei den Regenbogenforellen verursachte.

Für die hämatologischen Parameter wurden während des Versuchs einige signifikante Unterschiede zwischen Fischen aus den beiden Kreisläufen festgestellt. Zu Beginn des Versuchs wurden höhere Hämatokrit-Werte bei Fischen aus dem Kontrollkreislauf festgestellt. Aufgrund der Zellzählung sind die erhöhten Hämatokrit-Werte nicht auf eine Zunahme der Erythrozytenzahl zurückzuführen, sondern deuten auf eine Vergrößerung der Erythrozyten hin. Eine mögliche Erklärung für die höheren MCV- und MCH-Werte und die geringeren MCHC-Werten bei Fischen des Kontrollkreislaufs könnte u.a. eine unterschiedliche Anzahl an unreifen Erythrozyten sein (Soivio et al., 1977; Limsuwan et al., 1983; Pund, 1997), was auf eine Störung der Erythropoese hinweisen könnte. Bei der mittleren Probenahme war die Anzahl an Thrombozyten und Leukozyten bei Fischen des Belastungskreislaufs im Vergleich zu Fischen des Kontrollkreislaufs deutlich reduziert. Es ist

jedoch bekannt, dass Leukozytenzahlen bis hinunter auf 2000/ μ L nicht die Krankheitsresistenz beeinträchtigen (Wedemeyer, 1996). Da bei Fischen des Belastungskreislaufs eine deutlich höhere Anzahl an Leukozyten als 2000/ μ L nachgewiesen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass trotz der verringerten Anzahl an Leukozyten im Vergleich zu Fischen des Kontrollkreislaufs keine erhöhte Krankheitsanfälligkeit bestand. Die beobachtete Verringerung der Thrombozyten spricht auch nicht für erhöhten Stress bei den Fischen aus dem Belastungskreislauf, da die Thrombozyten bei erhöhtem Stress normalerweise deutlich erhöht sind (Casillas und Smith, 1977; Tavares-Dias und Oliveira, 2009). Wodurch die Reduktion der Thrombozyten ausgelöst wurde, kann in diesem Zusammenhang jedoch nicht eindeutig geklärt werden.

Am Ende des Versuchs war die relative Anzahl an Granulozyten bei Fischen aus dem Kontrollkreislauf signifikant höher im Vergleich zu Fischen aus dem Belastungskreislauf. Eine erhöhte Anzahl an Granulozyten kann ein Hinweis auf eine Entzündungsreaktion sein, kann aber auch durch Stress ausgelöst werden (Pund, 1997). Der Unterschied zwischen den Fischen der beiden Kreisläufe ist jedoch so marginal, dass man nicht von einem erhöhten Stressgeschehen im Kontrollkreislauf sprechen kann. Auch beim MCHC- und beim MCV-Wert wurden bei der dritten Probenahme signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kreisläufen festgestellt. Der höhere MCV-Wert bei Fischen des Kontrollkreislaufs spricht auch in diesem Fall für deutlich größere Erythrozyten im Vergleich zu Fischen des Belastungskreislaufs. Die erhöhten MCHC-Werte bei Fischen des Belastungskreislaufs weisen auf eine erhöhte Hämoglobin-Konzentration in den Erythrozyten hin.

Im Zuge des Langzeitversuchs wurde auch die bakterielle Belastung in den beiden Kreislaufsystemen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass das erhöhte Partikel-Aufkommen eine deutlich höhere bakterielle Belastung im Belastungskreislauf zur Folge hatte. Dies ist auch zu erwarten, da allgemein bekannt ist, dass sich Bakterien an Partikel heften (Kirchman und Ducklow, 1987) und die Partikel somit als Besiedlungsfläche und Nahrungssubstrat für die Bakterien dienen. Auch bei der Untersuchung der bakteriellen Besiedlung der Kiemen zeigte sich entsprechend bei Fischen aus dem Belastungskreislauf eine deutlich höhere bakterielle Belastung. Des Weiteren wurde das fischpathogene Bakterium *Flavobacterium columnare* bei Fischen aus dem Belastungskreislauf deutlich häufiger auf den Kiemen nachgewiesen. Trotz der höheren bakteriellen Belastung im

Belastungskreislauf ist die bakterielle Belastung in beiden Kreisläufen als subklinisch zu bewerten, so dass auch keine physiologischen Folgen zu erwarten sind. Dies bestätigten entsprechend auch die weiteren untersuchten physiologischen Parameter.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse des Langzeitversuchs, dass selbst eine chronische Partikelbelastung von über 30 mg/L über einen vollständigen Mastzeitraum keine negativen Auswirkungen auf die Physiologie der Regenbogenforellen hatte. Bei den Kiemen der Regenbogenforellen aus dem Belastungskreislauf zeigte sich durch die Bildung von mehr Schleimzellen pro Sekundärlamelle eine Adaption an die erhöhte Partikelbelastung, jedoch bewirkte das erhöhte Partikelauftreten keine strukturellen Schäden der Kiemen. Auch konnte bei der Wachstumsleistung kein negativer Einfluss der hohen Partikelkonzentration festgestellt werden.

Es bleibt also festzuhalten, dass auch bei einer chronischen Partikelbelastung von bis zu 70 mg/L über einen kompletten Mastzeitraum keine gravierenden Auswirkungen auf die Physiologie der Regenbogenforellen festzustellen waren. Einzig die bakterielle Belastung war im Belastungskreislauf erhöht, ohne jedoch physiologische Folgen zu verursachen. Die bisherige fachliche Einschätzung, dass sich Schwebstoffe in Kreislaufanlagen ab bestimmten Konzentrationen schädlich auf die Fischphysiologie auswirken, ist also grundsätzlich im Bereich realistischer Schwebstoffkonzentrationen im Kontext Fischzucht widerlegt.

8 Experiment 4: Formanalyse der suspendierten Feststoffe

8.1 Versuchsdurchführung

Als Grundlage für diesen Versuch dienen Messungen, die im Zuge des Langzeitversuchs gemacht wurden. Die Messungen wurden mit dem Particle Insight Size and Shape Analyzer von Micromeritics (USA) durchgeführt. Das Analysegerät wurde vor der Verwendung umgebaut, so dass anstatt von Messungen im Kreislauf die Wasserproben im Durchfluss gemessen werden konnten. Dabei wird kontinuierlich Wasser mit einem Schlauch angesaugt und mit Hilfe einer Pumpe (Masterflex L/S, Cole-Parmer) zum Analysegerät gefördert. Bei der Messung durchlaufen die im Anlagenwasser schwebenden Partikel eine dünne Durchflussküvette. Dabei beleuchtet eine Lichtquelle die Durchflussküvette und die dunklen Umrisse der Partikel werden auf den Sensor einer hochauflösenden Kamera projiziert (Abbildung 35). Anschließend können die gemessenen Partikel verschiedenen Form-Parametern zugeordnet werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse von einer Auswahl an Form-Parametern dargestellt. Für die Formanalyse wurden Messungen der Wochen 14 – 18 verwendet, die in den Becken, nach der mechanischen Filtration (Trommelfilter) und im Zulaufwasser der Fischbecken durchgeführt wurden.

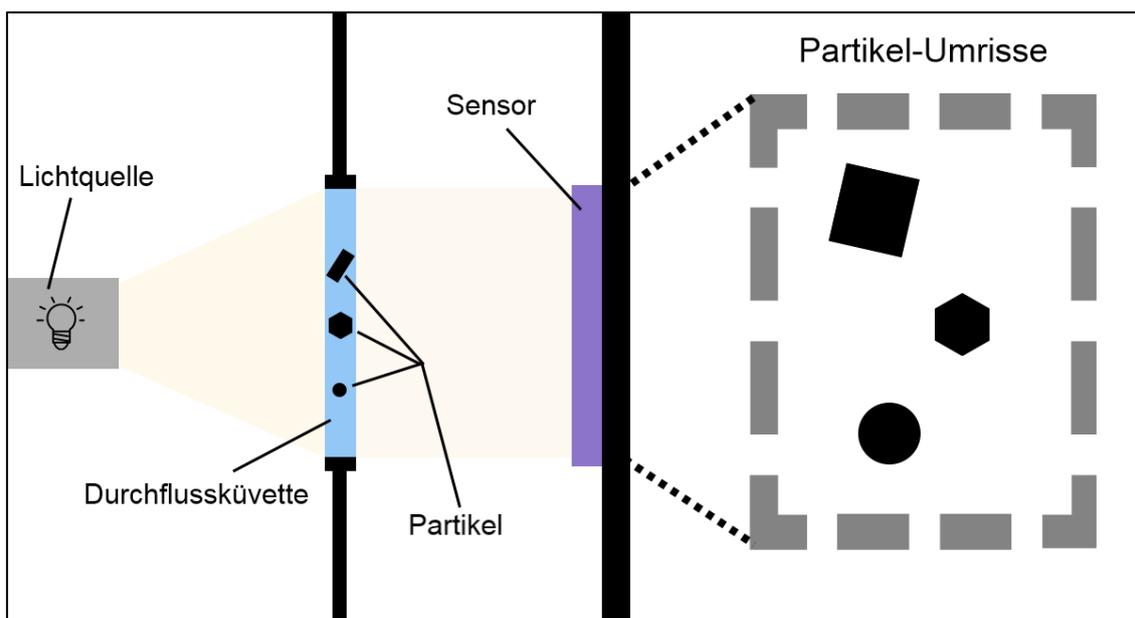


Abbildung 35: Schema der Partikel-Erfassung des Particle Insight Size and Shape Analyzer von Micromeritics.

Form-Parameter

Rundheit (Circularity)

Die Rundheit eines Partikels wird auf Grundlage der Fläche des Begrenzenden Kreisdurchmessers (BKD) berechnet. Die Rundheit ist definiert als der Anteil der Fläche des BKDs, der durch die Fläche des Partikels tatsächlich abgedeckt wird, wobei 1 für einen perfekten Kreis steht

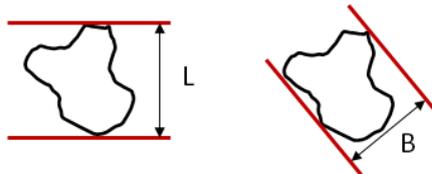
$$\text{Rundheit} = 4 \cdot \text{Fläche} / \pi \cdot \text{BKD}^2$$



Begrenzender
Kreisdurchmesser (BKD)

Feret-Durchmesser

Der Feret-Durchmesser beschreibt die Entfernung zwischen zwei Tangenten, in diesem Fall die minimale (Breite) und maximale Ausdehnung (Länge) der Partikel. Dabei wird die Messung von Länge und Breite nicht orthogonal zueinander durchgeführt. Dieser Parameter wird häufig auch „Schieblehren-Dimension“ genannt. Das Seitenverhältnis beschreibt das Verhältnis von Länge zu Breite.



Seitenverhältnis = L / B

8.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Großteil der Partikel aus den Kreislaufanlagen eine flockenartige Form hatte (Abbildung 36). Deutlich seltener waren faserförmige bzw. längliche Partikel (Abbildung 37). Es wurden aber auch untypische „Partikel“ gefunden, wie z.B. Rädertierchen (Abbildung 38).

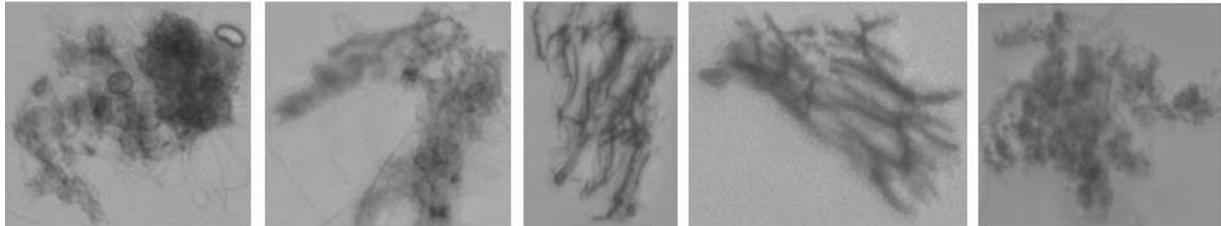


Abbildung 36: Flockenförmige Partikel

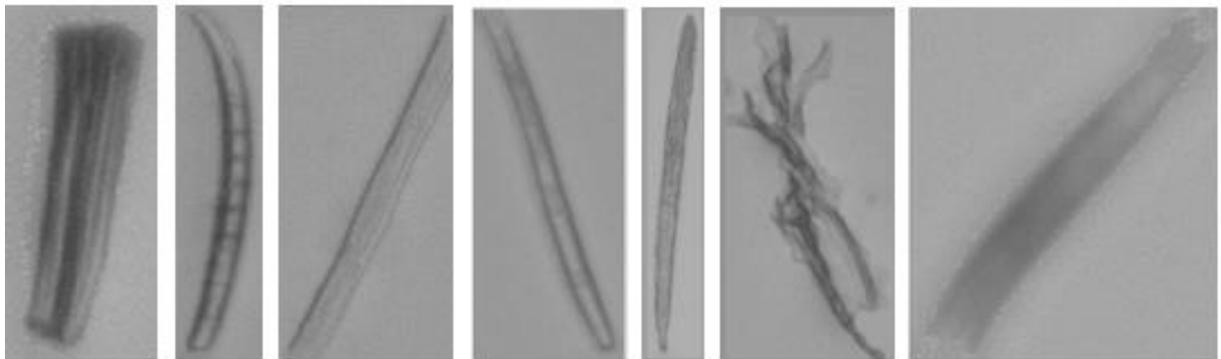


Abbildung 37: Faserförmige oder längliche Partikel

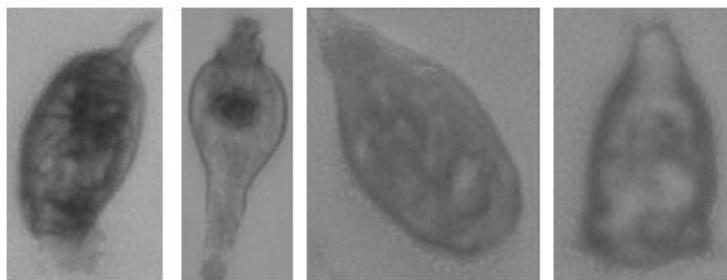


Abbildung 38: Rädertierchen

Form-Analyse der Partikel in den Fischbecken

Rundheit

In Abbildung 39 ist die prozentuale Verteilung des Parameters Rundheit für Partikel aus den Fischbecken des Kontroll- und Belastungskreislaufs dargestellt. Der mittlere Wert der Rundheit betrug im Kontrollkreislauf $0,521 \pm 0,005$ und im Belastungskreislauf $0,520 \pm 0,003$. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kreisläufen ($P > 0,05$). Es fällt jedoch auf, dass Partikel aus dem Belastungskreislauf im Bereich 0,4 – 0,6 deutlich höherer Anteile aufweisen, als Partikel aus dem Kontrollkreislauf. Im Gegensatz dazu weisen Partikel aus dem Kontrollkreislauf deutlich höhere Anteile im Bereich 0,1 – 0,3 und 0,8 – 1 auf.

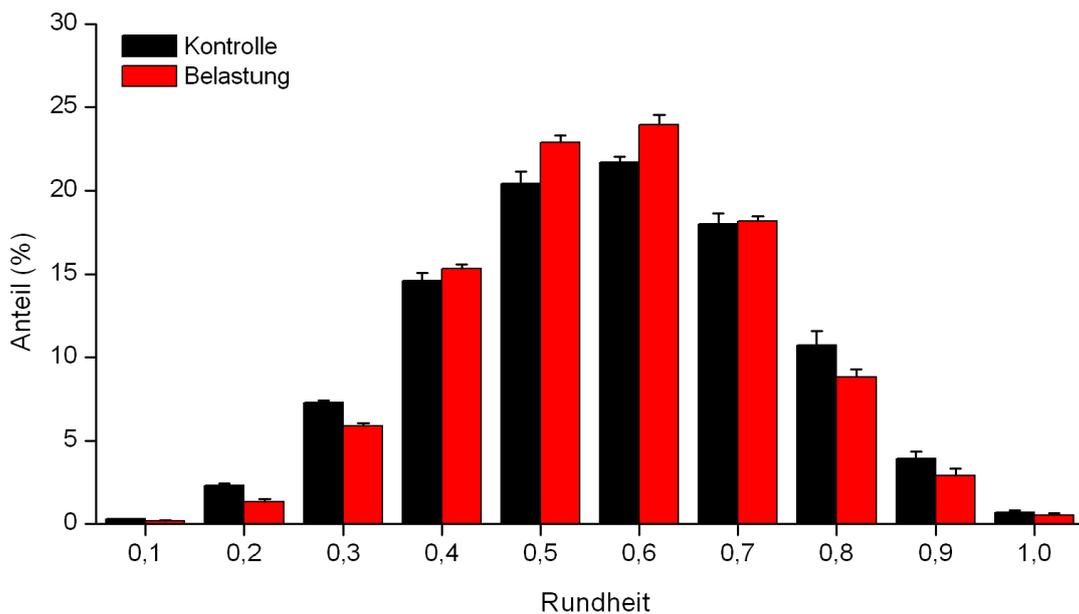


Abbildung 39: Rundheit der Partikel (MW \pm StAbw) in den Becken des Kontroll- und Belastungskreislauf.

Feret-Durchmesser

Der Vergleich der Feret-Breite von Partikeln aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf ist in Abbildung 40 dargestellt. Die mittlere Feret-Breite betrug $13,33 \pm 0,55 \mu\text{m}$ im Kontrollkreislauf und $13,28 \pm 0,57 \mu\text{m}$ im Belastungskreislauf und unterschied sich nicht signifikant zwischen den Kreisläufen ($P > 0,05$). Es zeigt sich, dass im Belastungskreislauf im Vergleich zum Kontrollkreislauf weniger Partikel der Größenklasse 3 – 10 μm zuzuordnen sind, aber dafür deutlich mehr Partikel der Größenklasse 10 – 20 μm angehören.

Der Parameter Feret-Breite stellt die geringste Abmessung der Partikel dar und spiegelt somit das Entnahmepotenzial der Partikel durch die mechanische Filtration wieder. So gesehen besteht auf Grundlage des Parameters Feret-Breite sowohl im Kontroll- als auch im Belastungskreislauf bei über 99 % aller Partikel ($> 3 \mu\text{m}$) das Potenzial durch die verwendete 100 μm Filtergaze des Trommelfilters zu gelangen.

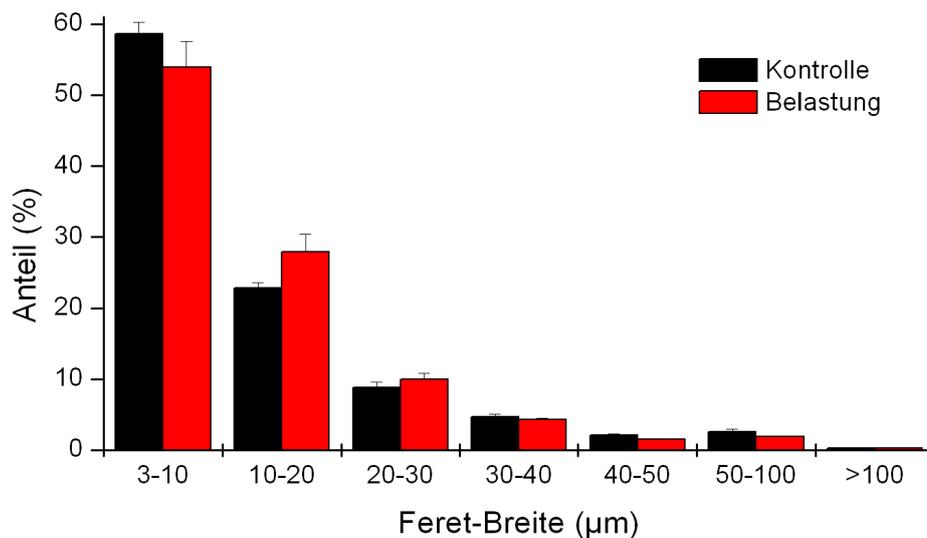


Abbildung 40: Feret-Breite (μm ; MW \pm StAbw) der Partikel in den Becken des Kontroll- und Belastungskreislaufs.

Die Feret-Länge der Partikel (Abbildung 41) unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Kreisläufen ($P > 0,05$). Die mittlere Feret-Länge betrug im Kontrollkreislauf $16,03 \pm 0,74 \mu\text{m}$ und im Belastungskreislauf $16,66 \pm 0,79 \mu\text{m}$.

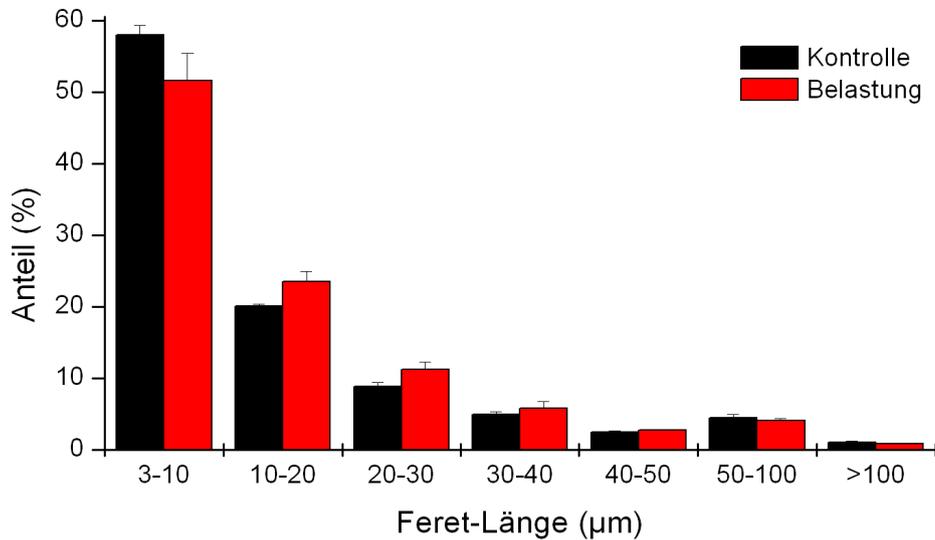


Abbildung 41: Feret-Länge (μm ; MW \pm StAbw) der Partikel in den Becken des Kontroll- und Belastungskreislaufs.

Das Feret-Seitenverhältnis der Partikel (Abbildung 42) unterschied sich signifikant ($P < 0,0001$) zwischen den beiden Kreisläufen. Das mittlere Feret-Seitenverhältnis der Partikel betrug $1,397 \pm 0,002$ im Kontrollkreislauf und $1,374 \pm 0,006$ im Belastungskreislauf.

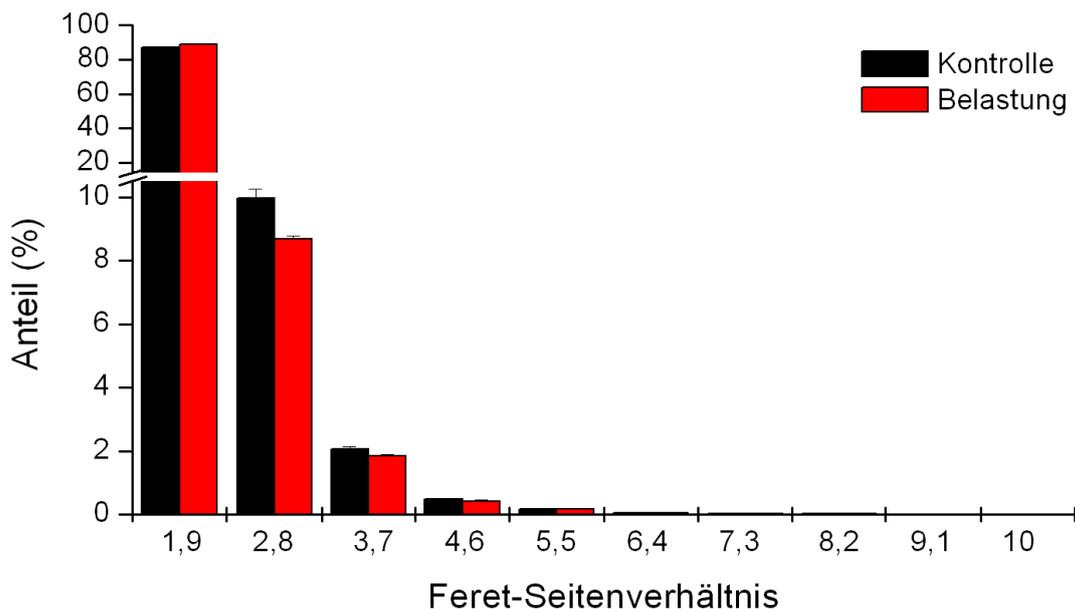


Abbildung 42: Die Verteilung des Feret-Seitenverhältnisses der Partikel (MW \pm StAbw) in den Becken des Kontroll- und Belastungskreislaufs. Bitte die Achsenunterbrechung der Y-Achse beachten.

Form-Analyse der Partikel nach der mechanischen Filtration (Trommelfilter)

Rundheit

Die Rundheit der Partikel nach der mechanischen Filtration (Abbildung 43) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Belastungskreislauf ($P > 0,05$). Die mittlere Rundheit betrug im Kontrollkreislauf $0,527 \pm 0,006$ und im Belastungskreislauf $0,519 \pm 0,010$.

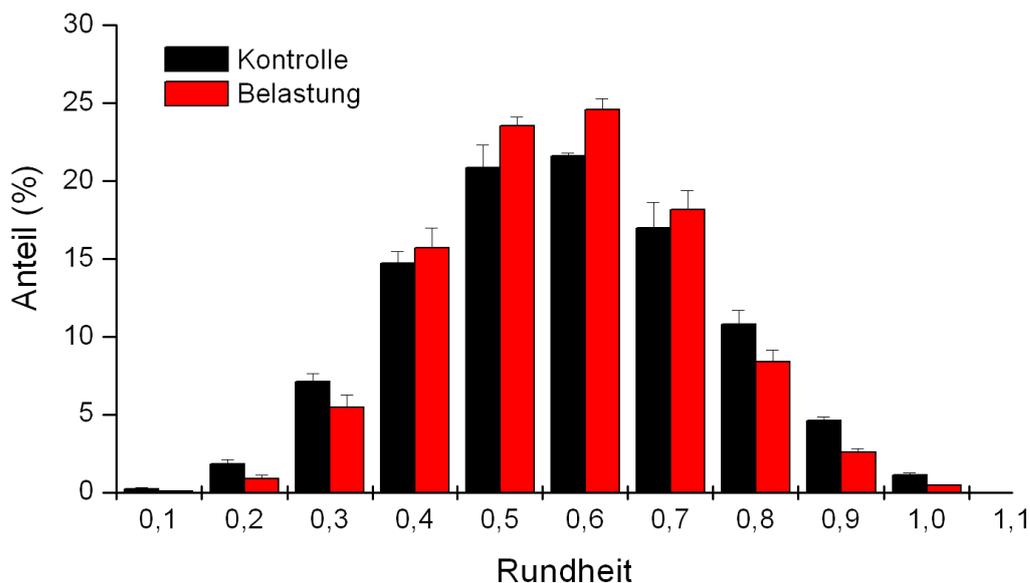


Abbildung 43: Rundheit der Partikel (MW \pm StAbw) nach dem Trommelfilter im Kontroll- und Belastungskreislauf.

Feret-Durchmesser

Nach der mechanischen Filtration (Abbildung 44) zeigte sich beim Parameter Feret-Seitenverhältnis kein signifikanter Unterschied zwischen Partikeln aus dem Kontroll- ($1,392 \pm 0,007$) und Belastungskreislauf ($1,368 \pm 0,020$). Die mittlere Feret-Breite der Partikel war im Belastungskreislauf ($14,31 \pm 0,37 \mu\text{m}$) jedoch signifikant höher ($P < 0,05$) als im Kontrollkreislauf ($12,22 \pm 1,06 \mu\text{m}$). Auch die Feret-Länge der Partikel war im Belastungskreislauf ($17,54 \pm 0,32 \mu\text{m}$) signifikant höher ($P < 0,05$) als im Kontrollkreislauf ($14,62 \pm 1,75 \mu\text{m}$).

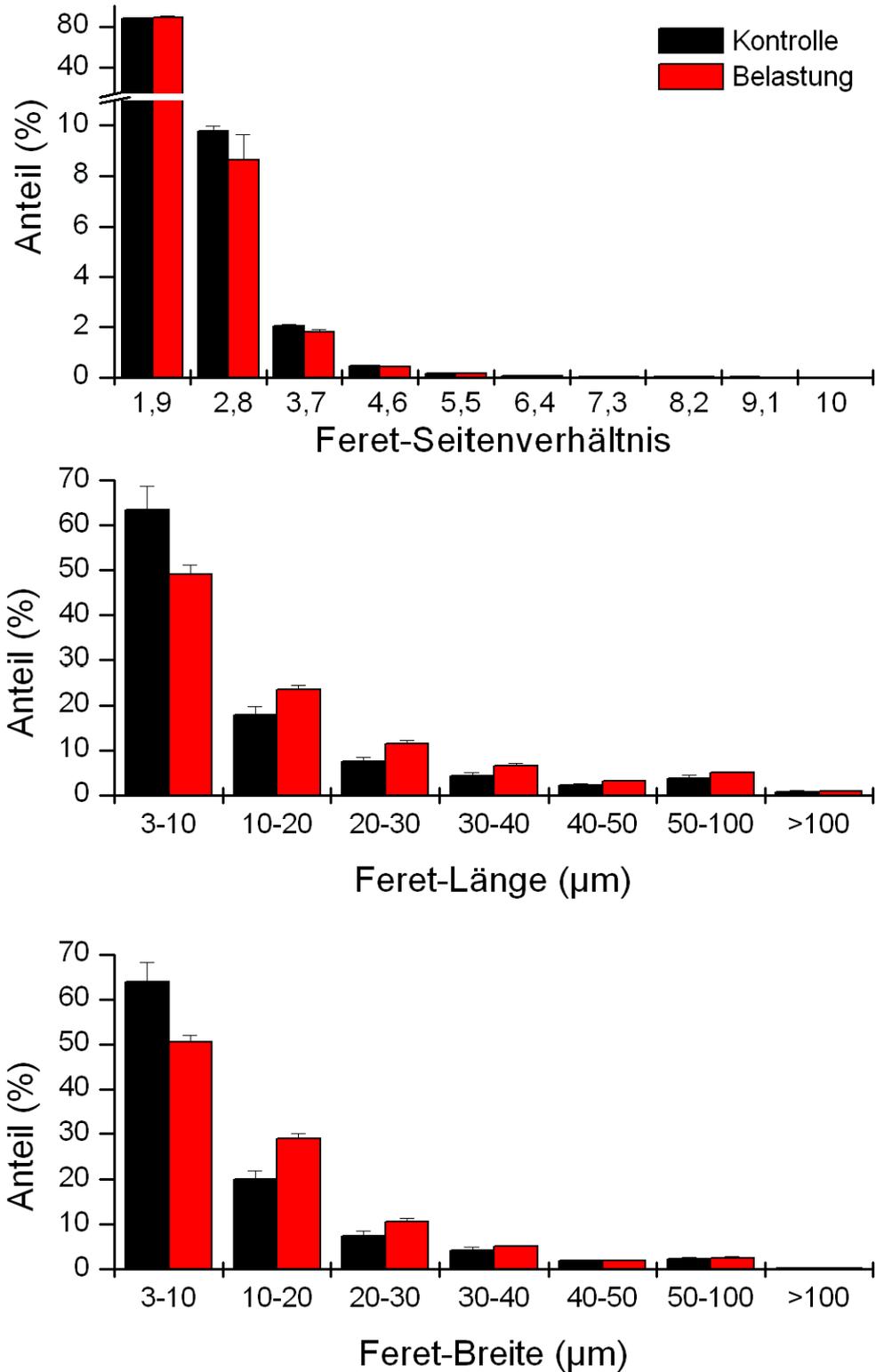


Abbildung 44: Form-Parameter Feret-Seitenverhältnis, Feret-Länge und Feret-Breite (MW ± StAbw) nach dem Trommelfilter im Kontroll- und Belastungskreislauf. Bitte die Achsenunterbrechung der Y-Achse beim Feret-Seitenverhältnis beachten.

Form-Analyse der Partikel im Zulaufwasser der Becken

Rundheit

Die Rundheit der Partikel im Zulaufwasser der Becken (Abbildung 43) unterscheidet sich signifikant zwischen Kontroll- und Belastungskreislauf ($P < 0,01$). Die mittlere Rundheit betrug im Kontrollkreislauf $0,522 \pm 0,001$ und im Belastungskreislauf $0,515 \pm 0,001$.

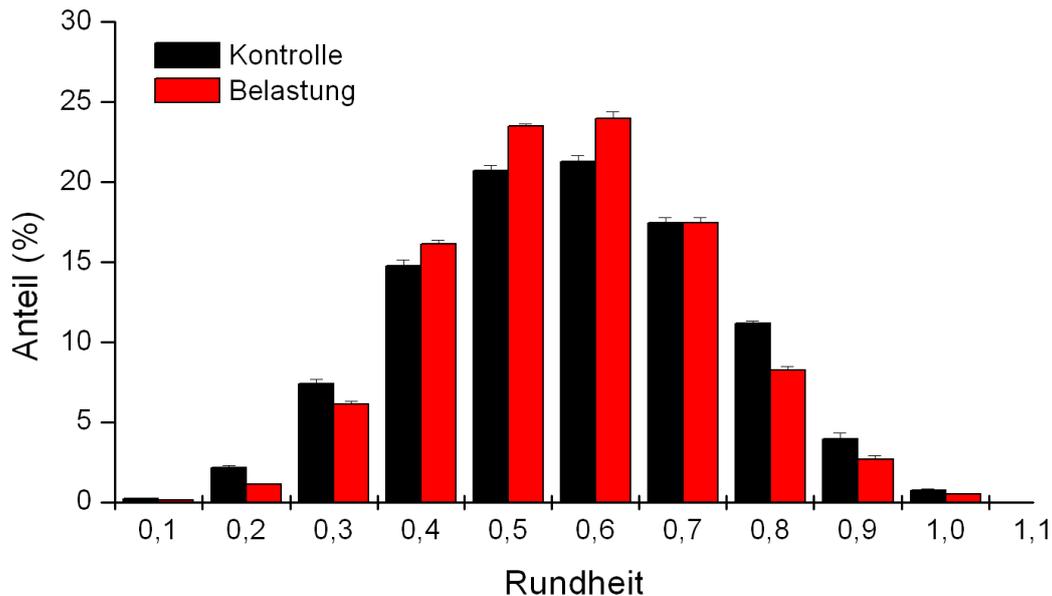


Abbildung 45: Rundheit der Partikel (MW \pm StAbw) im Zulaufwasser des Kontroll- und Belastungskreislaufs.

Feret-Durchmesser

Im Zulaufwasser der Fischbecken zeigte sich beim Feret-Seitenverhältnis der Partikel ein signifikanter Unterschied ($P < 0,0001$) zwischen Kontroll- und Belastungskreislauf. Das mittlere Feret-Seitenverhältnis betrug im Kontrollkreislauf $1,401 \pm 0,005$ und im Belastungskreislauf $1,374 \pm 0,002$. Auch bei der mittleren Feret-Breite wurde ein signifikanter Unterschied ($P < 0,001$) zwischen Kontroll- ($12,99 \pm 0,19 \mu\text{m}$) und Belastungskreislauf ($13,99 \pm 0,14 \mu\text{m}$) festgestellt. Die Feret-Länge der Partikel war im Belastungskreislauf ($17,31 \pm 0,02 \mu\text{m}$) signifikant höher ($P < 0,05$) als im Kontrollkreislauf ($15,55 \pm 0,22 \mu\text{m}$).

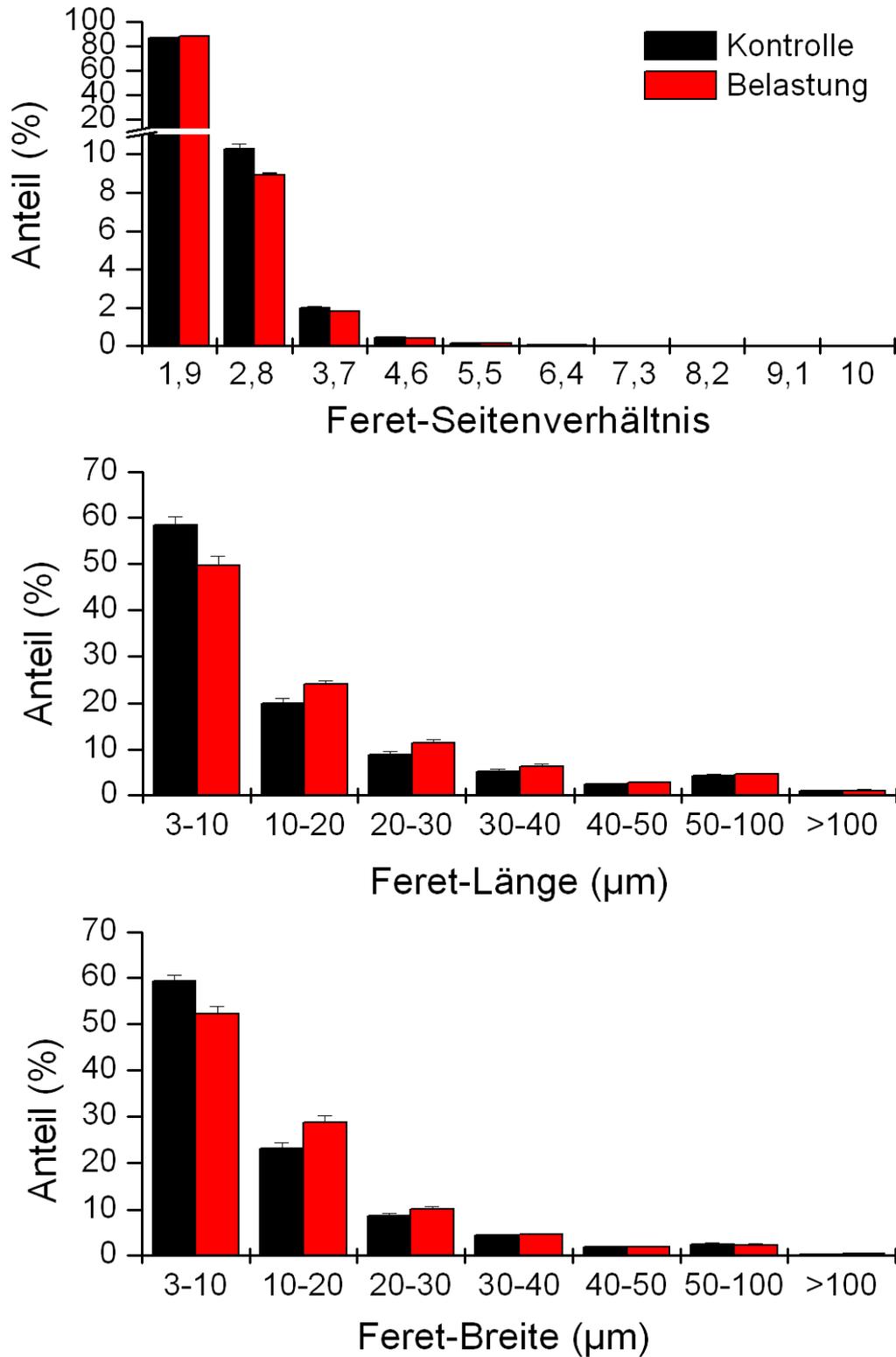


Abbildung 46: Form-Parameter Feret-Seitenverhältnis, Feret-Länge und Feret-Breite (MW ± StAbw) im Zulaufwasser des Kontroll- und Belastungskreislaufs. Bitte die Achsenunterbrechung der Y-Achse beim Feret-Seitenverhältnis beachten.

Vergleich der Partikelform zwischen den Probenahme-Orten

Kontrollkreislauf

Der Vergleich der Partikelform zwischen den Probenahme-Orten (Becken, nach Trommelfilter, im Zulauf der Becken) ergibt für den Kontrollkreislauf keine signifikanten Unterschiede bei den Parametern Feret-Breite, Feret-Länge und Feret-Seitenverhältnis ($P > 0,05$). Auch die Rundheit der Partikel zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Probenahme-Orten ($P > 0,05$).

Belastungskreislauf

Die Feret-Breite der Partikel unterscheidet sich signifikant zwischen den Probenahme-Orten „nach Trommelfilter“ und Becken ($P < 0,05$). Hingegen unterscheidet sich die Feret-Breite der Partikel im Zulauf der Becken nicht von den anderen Probenahme-Orten ($P > 0,05$). Bei der Feret-Länge, dem Feret-Seitenverhältnis und der Rundheit der Partikel ergeben sich zwischen den Probenahme-Orten keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$).

8.3 Diskussion

Die Aufnahmen des Particle Insight Size and Shape Analyzer zeigen, dass es sich bei den Schwebstoffen in den Versuchskreislaufanlagen hauptsächlich um flockenförmige Partikel gehandelt hat, die z.T. sehr feingliedrige Strukturen aufwiesen. In einer sehr viel geringeren Anzahl kamen auch faserförmige Partikel vor. Insgesamt wird dabei deutlich, dass scharfkantige bzw. eckige Strukturen bei den Partikeln äußerst selten waren. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Partikel in den Kreislaufanlagen nahezu vollständig organischen Ursprungs sind, da sie hauptsächlich aus dem Kot der Fische und zu einem geringen Anteil aus Futterresten entstehen. Damit unterscheiden sich diese Partikel deutlich von Partikeln im Freiland, wo z.B. nach Starkregenereignissen mehrheitlich mineralische Partikel auftreten, die aufgrund ihres scharfkantigen Charakters u.a. Kiemenstrukturen schädigen können (Kemp et al., 2011; Wong et al., 2013).

Die Analyse des Form-Parameters Rundheit erbrachte zwischen den Probeorten keine signifikanten Unterschiede. Zwischen den Kreisläufen zeigte sich bei der Rundheit der Partikel nur im Zulaufwasser der Becken ein signifikanter Unterschied. Dies ist vermutlich auf den Einsatz der Schlammpumpe zur Partikelanreicherung im Belastungskreislauf zurückzuführen. Denn so wurden Partikel aus dem Spülwasser der Trommelfilter durch die Verwendung der Schlammpumpe zerschlagen und wieder zurück in den Kreislauf eingebracht. Außerdem fiel auf, dass im Belastungskreislauf Partikel mit einer Rundheit von 0,4 – 0,7 deutlich häufiger waren als im Kontrollkreislauf. Hingegen waren die Anteile der Partikel im niedrigen (0,1 – 0,3) und hohen Bereich (0,8 – 1,0) im Kontrollkreislauf deutlich höher als im Belastungskreislauf.

Der Parameter Feret-Breite, der die minimale Ausdehnung der Partikel widerspiegelt, macht deutlich, dass in beiden Kreisläufen bei mehr als 99 % der Partikel das Potenzial besteht bei der mechanischen Filtration durch die verwendete 100 µm Gaze zu gelangen. Es fiel insgesamt auf, dass nur sehr wenige der Partikel größer als 100 µm waren. Dies ist vermutlich auf die Konstruktion der Fischbecken zurückzuführen. Denn in jedem Fischbecken befindet sich in der Mitte des Beckenbodens eine durch ein Gitter abgetrennte Kotgrube. Durch die vorherrschende Rundströmung in den Becken werden große, sedimentationsfähige Partikel in diese Kotgrube befördert und gelangen dann auch bei

größeren Turbulenzen nicht mehr ins Fischbecken zurück. Dadurch fiel der Anteil an großen Partikeln bei den Messungen sehr gering aus.

Bei Partikeln des Belastungskreislaufs war sowohl die Feret-Breite als auch die Feret-Länge nach der mechanischen Filtration deutlich größer als in den Becken. Man würde jedoch erwarten, dass – wie im Kontrollkreislauf beobachtet wurde – die Feret-Breite und die Feret-Länge nach der mechanischen Filtration durchschnittlich kleiner ist als davor, da durch die mechanische Filtration größere Partikel potentiell häufiger durch dem Trommelfilter entnommen werden als Partikel mit geringer Ausdehnung (Patterson und Watts, 2003). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass aufgrund der hohen Partikelkonzentration im Belastungskreislauf ein erhöhtes Potenzial des Agglomerierens bestand. Es wurde während der Versuche beobachtet, dass es im Trommelfilter des Belastungskreislaufs häufig zu massiven partikulären Ablagerungen kam. Diese wurden zwar regelmäßig entfernt, jedoch waren danach relativ schnell wieder Ablagerungen zu beobachten. Die Proben für die Messungen wurden direkt am Auslauf des Trommelfilters genommen, so dass agglomerierte Partikeln in die Probe gelangten. Die Form-Analyse der Partikel im Kontrollkreislauf zeigt hingegen, dass die mechanische Filtration zu einer deutlichen Reduktion der Feret-Breite und Feret-Länge geführt hat. Das Feret-Seitenverhältnis der Partikel war an allen drei Probenahme-Orten im Kontrollkreislauf geringfügig höher als im Belastungskreislauf, was wie schon o.g. wurde vermutlich auch auf den Einsatz der Schlammpumpe im Belastungskreislauf zurückzuführen ist.

Insgesamt hat die Formanalyse der Partikel der Kreislaufanlagen gezeigt, dass es sich hauptsächlich um flockenförmige Partikel handelt, die keine scharfkantigen Strukturen aufweisen und somit nur ein sehr geringes mechanisches Schadpotential für die Kiemen der Fische darstellen. Die Ergebnisse in Bezug auf die Feret-Breite der Partikel untermauern das hohe Anreicherungspotential der Partikel in Kreislaufanlagen. Jedoch konnte auch belegt werden, dass durch die Verwendung von Kotgruben in den Fischbecken und die Trommelfilter große Partikel effektiv aus dem System entnommen werden können. Die beobachtete Agglomeration von Partikeln im Belastungskreislauf wurde durch die hohe Partikelbelastung hervorgerufen.

9 Experiment 5: Langzeitexposition bei einer Partikelbelastung von über 35 mg/L und zusätzlich erhöhter NH_3 -Konzentration

9.1 Versuchsdurchführung

Da bei den vorangegangenen Versuchen keine negativen Auswirkungen von erhöhter Partikelbelastung in Bereichen, die maximal in der Fischzucht auftreten können, festgestellt werden konnten, wurde in diesem abschließenden Versuch überprüft, wie sich erhöhte Partikelbelastung bei gleichzeitig erhöhten NH_3 -Werten auf Regenbogenforellen auswirken. Dabei sollte überprüft werden, ob bei zusätzlicher Belastung durch erhöhte NH_3 -Werte die Regenbogenforellen im Belastungskreislauf stärker auf die Partikelbelastung reagieren und sich so die Beobachtung der Schadwirkung durch Partikel aus der Literatur erklären lassen (Chapman et al., 1987; Chen und Malone, 1991; Bash et al., 2001, Wong et al., 2013). Die Erhöhung der NH_3 -Konzentration wurde zum einen durch das Anheben des pH-Werts und zum anderen durch die zusätzliche Zugabe von Ammoniumchlorid erreicht. Zusätzlich wurde aus beiden Biofiltern noch Trägermaterial entnommen, um die Kapazität der Biofilter zu verringern. Für die Überwachung des pH-Werts wurden pH-Sonden (OxyGuard, inkl. pH-Manta) in beiden Systemen installiert, um eine ständige Überwachung des pH-Werts zu gewährleisten. Bei Unterschreitung eines bestimmten pH-Werts wurde automatisch mit Hilfe von Pumpen wässrige Natriumhydrogencarbonat-Lösung in die Wasserpuffer der Systeme gepumpt, bis der pH-Wert wieder die gewünschte Höhe erreicht hatte. Wie schon bei den vorhergehenden Versuchen wurde ein Kreislauf als Kontrolle unter Normalbedingungen jedoch mit erhöhter Ammoniakkonzentration betrieben, während im anderen Kreislauf neben der Ammoniakkonzentration auch wieder die Partikelkonzentration artifiziell erhöht wurde.

Der Versuch wurde in drei Phasen unterteilt (Abbildung 47): in der ersten Phase (Start bis Ende Woche 5) wurde die Partikelkonzentration im Belastungskreislauf auf über 30 mg/L erhöht. In der zweiten Phase (Woche 6 bis Ende Woche 10) wurde die Partikelkonzentration im Belastungskreislauf konstant über 30 mg/L gehalten. Zusätzlich wurde in beiden Systemen der pH-Wert von 7,5 auf ungefähr 8 erhöht und die $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration durch Zugabe von Ammoniumchlorid deutlich erhöht, wodurch die NH_3 -Konzentration entsprechend gesteigert wurde. Da in der zweiten Phase keine negativen Auswirkungen des Anstiegs der NH_3 -Konzentration auf die Fische festzustellen waren, wurde der Versuch um

zwei weitere Woche verlängert. In dieser dritten Phase (Woche 11) wurde die $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration und somit auch die NH_3 -Konzentration in beiden Kreisläufen nochmals deutlich gesteigert. Pro Kreislauf waren zudem zusätzlich noch fünf verschiedene Beleuchtungsstärken (50, 100, 200, 300 und 600 lux) eingesetzt, um mögliche Auswirkungen unterschiedlicher Lichtverfügbarkeit auf die Fische zu testen, insbesondere bei der erhöhten Trübung im Belastungskreislauf. Die Beleuchtungsstärke wurde pro Kreislauf für jeweils 2 Becken randomisiert verteilt. Für die Bestimmung der bakteriellen Belastung wurde in diesem Versuch anstelle der Plattenmethode (koloniebildende Einheiten) die Bactiquant-Methode der Firma Mycometer verwendet, die auf der Messung von mikrobieller Enzymaktivität beruht. Dadurch kann die Aktivität aller Bakterien erfasst werden, auch solcher, die an Partikel geheftet sind. Bei der Plattenmethode werden beispielsweise mehrere Bakterien, die partikelgebunden sind, in der Regel nur als eine Kolonie gezählt, wodurch die Ergebnisse nicht das tatsächliche Bakterienaufkommen widerspiegeln und für unterschiedliche TSS-Konzentrationen ein systematischer Fehler entsteht.

Pro Kreislaufsystem wurden 785 Regenbogenforellen (rein weiblich, Fischzucht Störk) eingesetzt und bis zu einer maximalen Besatzdichte von $67,8 \pm 3,0 \text{ kg m}^{-3}$ (Kontrolle) bzw. $68,3 \pm 2,6 \text{ kg m}^{-3}$ (Belastung) gehalten. Das mittlere Gewicht der Regenbogenforellen betrug zu Beginn des Experiments $87,2 \pm 8,6 \text{ g}$ (Kontrolle) bzw. $87,4 \pm 9,2 \text{ g}$ (Belastung). Die Fische wurden an sechs Tagen in der Woche (Sonntag-Freitag) gefüttert. Die restriktive Futtergabe erfolgte jeweils am Morgen und am Nachmittag per Handfütterung. Als Futter wurde für beide Kreisläufe EFICO Enviro 921 (Biomar, Dänemark) verwendet. Zu Beginn des Versuchs betrug die Futtermenge 2,5 % des Körpergewichts und wurde im Laufe des Experiments auf 1,3 % verringert. Die Probenahmen erfolgten bei diesem Versuch zu Beginn des Experiments, in Woche 5, in Woche 10 und am Ende des Versuchs in Woche 13. Die Wägungen der Fische wurden zu Beginn und am Ende des Versuchs durchgeführt.

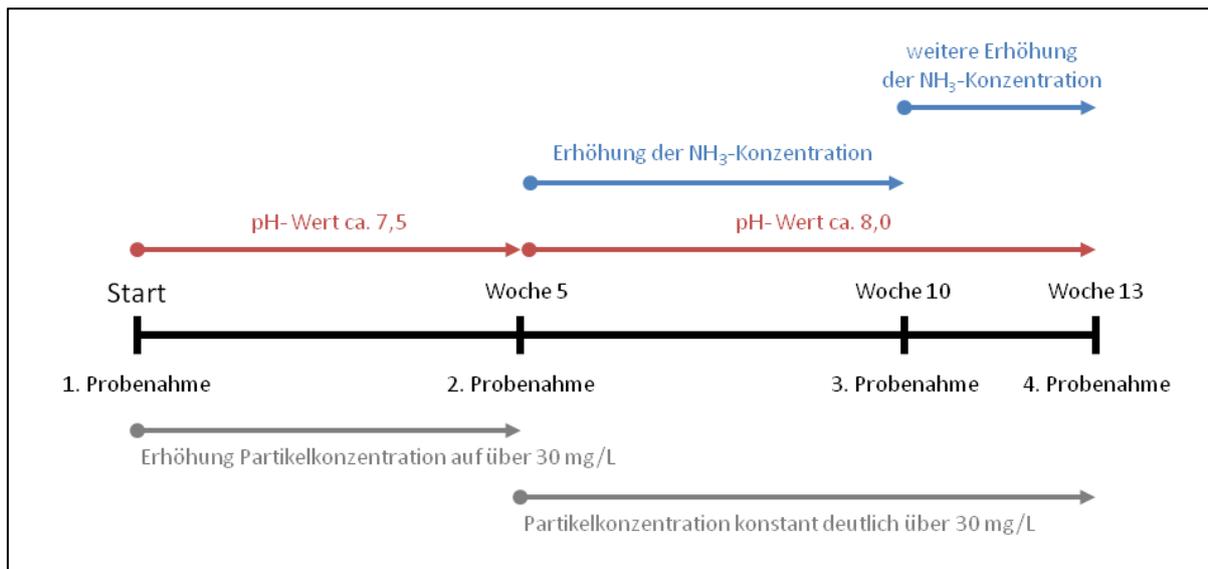


Abbildung 47: Schema des Versuchsaufbaus.

9.2 Ergebnisse

9.2.1 Wasserparameter

Für die Parameter pH, O_2 und Wassertemperatur wurde pro Tag der Mittelwert berechnet und zwischen den Kreisläufen verglichen. Hinsichtlich O_2 -Konzentration und pH gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kreisläufen ($P > 0,05$). Die Wassertemperatur war hingegen im Kontrollkreislauf den gesamten Versuchszeitraum signifikant höher ($P < 0,001$). Da dieser Versuch bei sehr kalten Außentemperaturen stattfand ist die geringere Temperatur im Belastungskreislauf vermutlich auf die Lage dieser Kreislaufanlage direkt an der Gebäudeaußenwand zurückzuführen. Die Trübung im Belastungskreislauf war in allen drei Phasen des Versuchs im Vergleich zum Kontrollkreislauf signifikant höher ($P < 0,001$). Bei der $\text{NO}_2\text{-N}$ -Konzentration ergab sich in Phase 3 ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zwischen den beiden Kreisläufen, der jedoch aufgrund des hohen pH-Werts und des dadurch resultierenden geringen Anteils an salpetriger Säure als biologisch nicht relevant eingeschätzt werden kann. Die CO_2 -Konzentration betrug durchschnittlich $15,9 \pm 2,6$ mg/L im Kontrollkreislauf bzw. $16,2 \pm 2,4$ mg/L im Belastungskreislauf und unterschied sich nicht signifikant ($P > 0,05$). Der Wasserverbrauch betrug durchschnittlich $237,8 \pm 70,6$ L/Tag im Kontrollkreislauf und $213,6 \pm 145,6$ L/Tag im Belastungskreislauf. Die mittlere NH_3 -Konzentration (Tabelle 16), errechnet aus mittlerer Temperatur, pH-Wert und $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration pro Tag, unterschied sich in allen drei Phasen nicht signifikant ($P > 0,05$) zwischen den Kreisläufen. Die maximale $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration in Phase 3 betrug im

Fischgesundheit und Schwebstoffbelastung in Kreislaufanlagen

Kontrollkreislauf 2,54 mg/L und im Belastungskreislauf 2,34 mg/L, was bei einem pH von 7,9 in beiden Kreisläufen einer NH_3 -Konzentration von über 0,04 mg/L entspricht.

Tabelle 15: Wasserparameter (MW \pm StAbw.) des Kontroll- und Belastungskreislaufsystems.

	Phase 1		Phase 2		Phase 3	
	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung
	MW \pm StAbw	MW \pm StAbw				
pH	7,55 \pm 0,10	7,53 \pm 0,09	7,87 \pm 0,15	7,86 \pm 0,13	7,90 \pm 0,10	7,88 \pm 0,07
O ₂ (mg/L)	10,7 \pm 0,2	10,6 \pm 0,3	11,5 \pm 0,4	11,5 \pm 0,4	11,7 \pm 0,2	11,6 \pm 0,4
Wassertemperatur (°C)	14,5 \pm 0,3***	14,3 \pm 0,3***	14,7 \pm 0,2***	14,2 \pm 0,3***	14,8 \pm 0,2***	14,2 \pm 0,2***
NH ₄ -N (mg/L)	0,556 \pm 0,121	0,601 \pm 0,107	0,668 \pm 0,181	0,714 \pm 0,188	1,100 \pm 0,239	1,140 \pm 0,254
NO ₂ -N (mg/L)	0,408 \pm 0,234	0,387 \pm 0,148	0,533 \pm 0,092	0,487 \pm 0,081	0,682 \pm 0,135*	0,529 \pm 0,080*
NO ₃ -N (mg/L)	177,0 \pm 35,2	169,6 \pm 32,7	221,5 \pm 8,7	210,0 \pm 19,3	279,8 \pm 26,3	271,0 \pm 23,0
Trübung (NTU)	2,1 \pm 0,6***	11,6 \pm 4,2***	2,4 \pm 0,3***	16,9 \pm 2,1***	2,8 \pm 0,4***	18,0 \pm 1,7***

* = signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen.

*** = signifikanter Unterschied ($P < 0,001$) zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 16: NH₃-Konzentration (mg/L; Mittelwert \pm StAbw) des Kontroll- und Belastungskreislauf, errechnet aus mittlerer Temperatur, pH-Wert und NH₄-N-Konzentration pro Tag. Es wurden keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen den beiden Kreisläufen gefunden.

	Phase 1		Phase 2		Phase 3	
	MW \pm StAbw	Bereich	MW \pm StAbw	Bereich	MW \pm StAbw	Bereich
Kontrolle	0,005 \pm 0,001	0,003-0,007	0,013 \pm 0,004	0,005-0,023	0,023 \pm 0,003	0,017-0,031
Belastung	0,005 \pm 0,001	0,003-0,006	0,013 \pm 0,004	0,005-0,019	0,022 \pm 0,003	0,016-0,027

Messung der Lichtstärke im Wasser

Die Beleuchtungsstärke wurde pro Kreislauf für jeweils 2 Becken randomisiert verteilt (Tabelle 17). Für die Messung der Lichtstärke im Wasser wurde das Luxmeter T-10WsA (Konica Minolta) eingesetzt. Die Messung der Lichtstärke erfolgte pro Becken jeweils an der Wasseroberfläche und in 10 cm, 20 cm, 30 cm und 40 cm Wassertiefe.

Tabelle 17: Verteilung der Beleuchtungsstärke im Kontroll- und Belastungskreislauf.

	Kontrolle	Belastung
Becken 1 + 2	600 lux	100 lux
Becken 3 + 4	200 lux	600 lux
Becken 5 + 6	50 lux	300 lux
Becken 7 + 8	300 lux	50 lux
Becken 9 + 10	100 lux	200 lux

In Abbildung 48 ist die prozentuale Veränderung der Lichtstärke in der Wassersäule in den Versuchsbecken des Kontroll- und Belastungskreislaufs dargestellt. Insgesamt sieht man deutlich, dass bei der erhöhten Partikelkonzentration im Belastungskreislauf die Lichtstärke mit steigender Wassertiefe sehr viel stärker reduziert wird, als das im Kontrollkreislauf der Fall ist. Im Belastungskreislauf verringerte sich die Lichtstärke innerhalb der ersten 10 cm Wassertiefe um ca. 80 % und betrug in 40 cm Wassertiefe durchschnittlich nur noch 0,3 bis 1,5 % der Ausgangslichtstärke. Die Lichtstärke im Kontrollkreislauf nahm während des Versuchszeitraums mit steigender Versuchsdauer deutlich ab. Während in Woche 6 noch ca. 40 % der Lichtstärke in 10 cm Wassertiefe gemessen wurden, waren es in Woche 11 noch ca. 27 % und in Woche 12 nur noch ca. 23 %. Schaut man auf die Partikelkonzentration an den jeweiligen Messtagen, zeigt sich dass die Lichtstärke in Woche 12 im Kontrollkreislauf trotz leicht geringer Partikelbelastung im Vergleich zu Woche 11 niedriger ausfällt. Gleiches gilt auch für die Ergebnisse des Belastungskreislaufs. Die Reduzierung der Lichtstärke im Wasser im Laufe des Untersuchungszeitraums könnte auf eine Braunfärbung des Anlagenwassers zurückzuführen sein, die sich mit Voranschreiten des Versuches verstärkte. Eine weitere mögliche Erklärung wäre die Anreicherung von Feinstpartikeln, die aufgrund der größeren spezifischen Oberfläche bei gleicher Masse im Vergleich zu größeren Partikeln das Wasser stärker eintrübten und somit eine stärkere Reduzierung der Lichtstärke bewirkten.

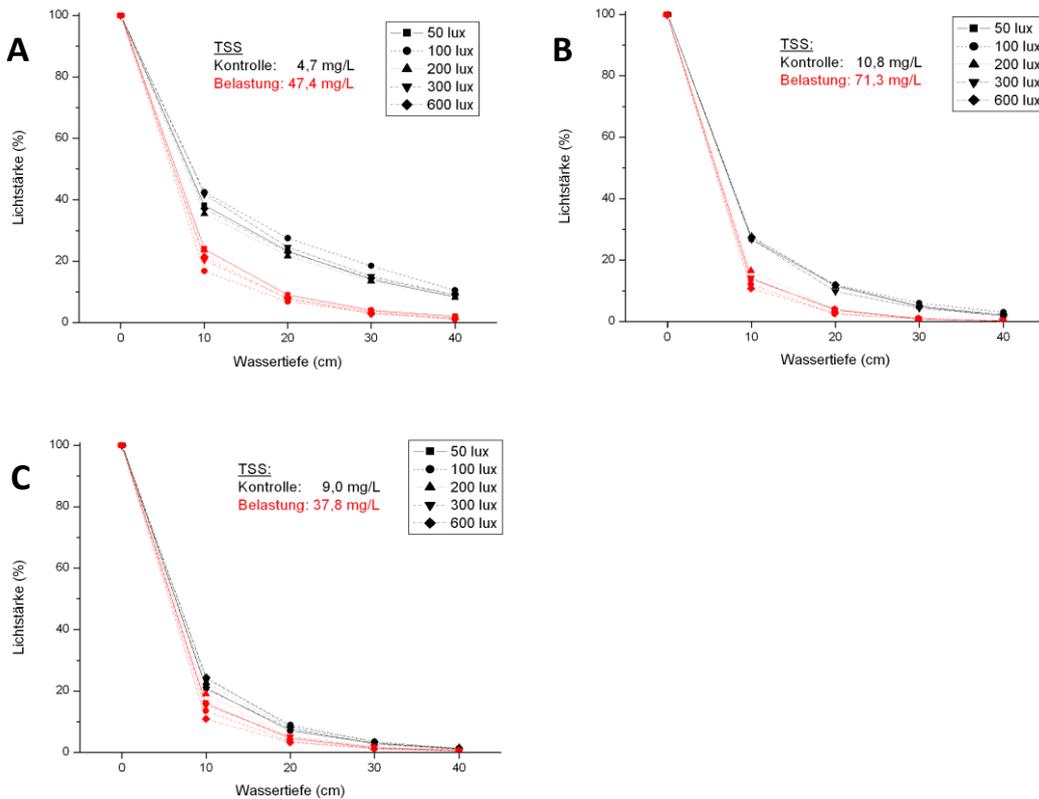


Abbildung 48: Prozentuale Veränderung der Lichtstärke in der Wassersäule der Versuchsbecken im Kontroll- und Belastungskreislauf in Woche 6 (A), Woche 11 (B) und Woche 12 (C).

10.2.2 Leistungsparameter der Fische

In Tabelle 18 sind die Leistungsparameter der Regenbogenforellen des Kontroll- und Belastungskreislaufs aufgeführt. Insgesamt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf. Fische in beiden Kreisläufen zeigten eine sehr gute Wachstumsleistung. Auch die etwas geringere Wassertemperatur im Belastungskreislauf hatte somit keine Auswirkung auf das Wachstum der Fische. Wie schon in den anderen Versuchen beobachtet, zeigten die Regenbogenforellen im Belastungskreislauf ein deutlich ruhigeres und weniger aggressives Fressverhalten als die Regenbogenforellen im Kontrollkreislauf. Auch war eine deutliche Verzögerung bis zur Futteraufnahme zu beobachten.

Tabelle 18: Endgewicht, Überlebensrate, Futterquotient (FQ), spezifische Wachstumsrate (SWR) und temperaturbereinigter Wachstumskoeffizient (TGC) der Fische im Kontroll- und Belastungskreislauf (MW ± StAbw.).

	Kontrolle	Belastung	Statistische Signifikanz
Endgewicht (g)	315,6 ± 61,0	317,1 ± 61,5	n.s.
Überlebensrate (%)	99,2 ± 1,1	99,6 ± 0,6	n.s.
FQ	0,89 ± 0,04	0,89 ± 0,05	n.s.
SWR (%/Tag)	1,49 ± 0,04	1,50 ± 0,05	n.s.
TGC	1,83 ± 0,06	1,88 ± 0,08	n.s.

9.2.3 Partikel-Analyse

Partikelkonzentration

Die Partikelkonzentration im Kontroll- und Belastungskreislauf (Abbildung 49) unterschied sich während des gesamten Versuchszeitraums signifikant voneinander ($P < 0,0001$). Im Kontrollkreislauf war die Partikelbelastung während des gesamten Versuchs deutlich niedriger als im Belastungskreislauf und schwankte zwischen 1,3 und 9,4 mg/L. Im Vergleich dazu nahm die Partikelkonzentration im Belastungskreislauf innerhalb der ersten drei Wochen auf über 30 mg/L zu und schwankte im weiteren Verlauf des Versuchs morgens zwischen 30,5 und 60,7 mg/L. Im Tagesverlauf wurden im Belastungskreislauf sogar Partikelkonzentrationen von über 70 mg/L gemessen, während im Kontrollkreislauf die Maximalkonzentration 14,3 mg/L betrug.

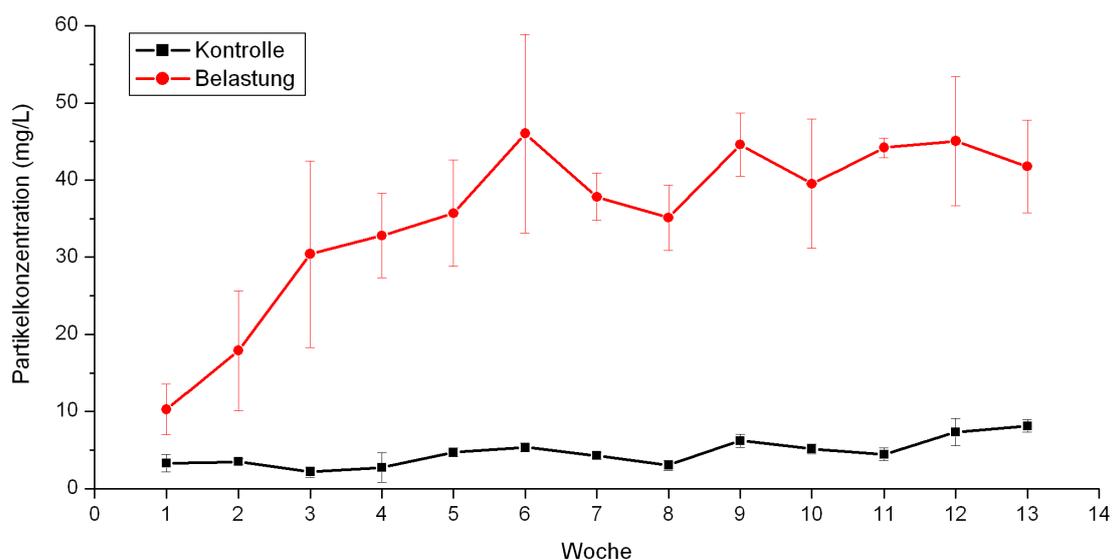


Abbildung 49: Entwicklung der Partikelkonzentration (Mittelwert ± StAbw.) im Kontroll- und Belastungskreislauf während des Untersuchungszeitraums. Probenahme: früher Morgen vor der Fütterung.

Partikelgrößen-Verteilung

Die Partikelgrößen-Analyse erbrachte für alle Größenklasse signifikante Unterschiede ($P < 0,001$) zwischen Kontroll- und Belastungskreislauf. Insgesamt waren deutlich mehr Partikel aller Größenklassen im Belastungskreislauf. In beiden Kreisläufen dominierten die Partikelgrößen $< 15 \mu\text{m}$, so waren im Kontrollkreislauf 98,6 % und im Belastungskreislauf 98,3 % aller Partikel $< 15 \mu\text{m}$.

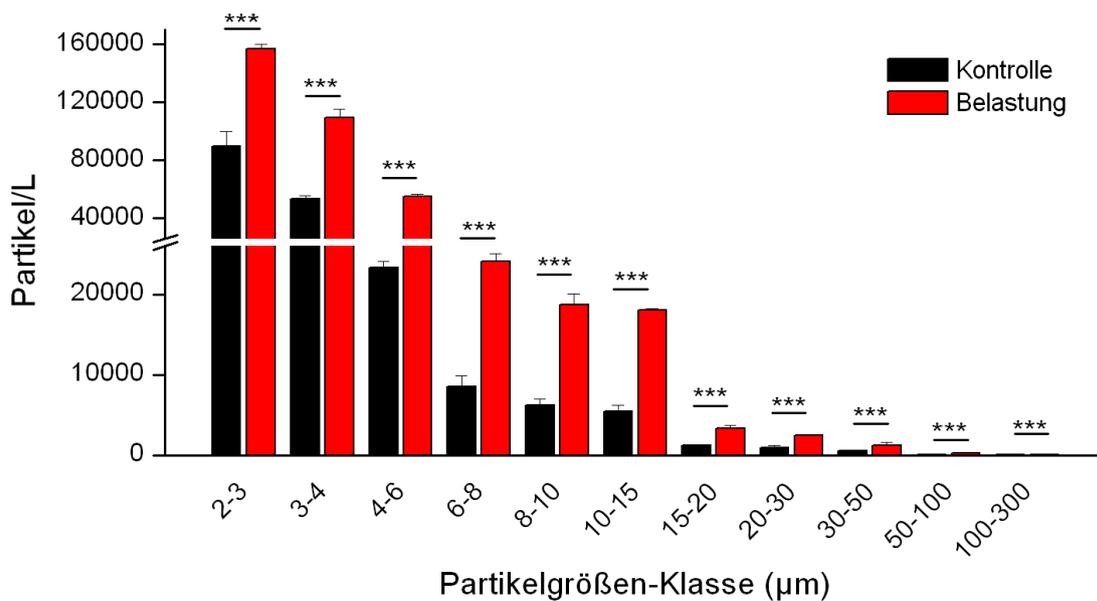


Abbildung 50: Absolute Häufigkeiten der Partikelgrößen-Klassen (MW \pm StFehler) im Kontroll- (n = 9) und Belastungskreislauf (n = 9) in den Wochen 4 – 12; *** = signifikanter Unterschied ($P < 0,001$) zwischen den beiden Kreisläufen. Bitte die Achsenunterbrechung der Y-Achse beachten.

9.2.4 Parameter Fischgesundheit

Hämatologie

Die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung von Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf sind in Tabelle 19 dargestellt. Um zu überprüfen, ob die Lichtstärke, der Zeitpunkt der Probenahme oder der Kreislauf einen signifikanten Effekt auf die hämatologischen Parameter hatte, wurde ein generelles lineares Model gerechnet (Tabelle 20). Die Signifikanz der einzelnen Modelleffekte wurde mittels Tukey's HSD (honest significant difference) post hoc-Test bzw. Student-t-Test überprüft.

Fischgesundheit und Schwebstoffbelastung in Kreislaufanlagen

Tabelle 19: Hämatologische Parameter der Regebogenforellen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf, die zu Beginn, in Woche 5 (2. Probenahme), in Woche 10 (3. Probenahme) und in Woche 13 (4. Probenahme) untersucht wurden.

	Start		2. Probenahme	
	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung
Erythrozyten ($10^6/\mu\text{L}$)	1,07 ± 0,14	1,10 ± 0,13	1,03 ± 0,11	1,05 ± 0,10
Thrombozyten ($10^4/\mu\text{L}$)	1,32 ± 0,29	1,44 ± 0,36	1,26 ± 0,24	1,20 ± 0,25
Leukozyten ($10^4/\mu\text{L}$)	2,86 ± 0,59	2,78 ± 0,59	2,49 ± 0,62	2,76 ± 0,47
Lymphozyten (%)	96,8 ± 1,6	97,1 ± 1,8	96,8 ± 2,2	97,6 ± 1,3
Granulozyten (%)	2,4 ± 1,6	1,9 ± 1,5	2,4 ± 1,7	1,5 ± 1,2
Monozyten (%)	0,8 ± 0,7	1,0 ± 0,7	0,9 ± 0,9	0,9 ± 0,8
Hämatokrit	34,6 ± 2,4	33,9 ± 2,5	34,5 ± 2,9	32,3 ± 2,8
Leukokrit	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2
Glukose	62,6 ± 6,3	61,0 ± 7,0	58,3 ± 4,9	59,9 ± 5,3
Hämoglobin	9,2 ± 0,7	9,5 ± 0,6	9,5 ± 0,8	9,8 ± 0,9
MCH	87,0 ± 12,0	87,3 ± 8,9	92,7 ± 6,9	95,0 ± 10,5
MCHC	26,6 ± 1,5	28,2 ± 1,3	27,7 ± 1,6	30,4 ± 2,5
MCV	326,1 ± 37,6	309,3 ± 29,8	335,3 ± 22,8	309,8 ± 25,8

	3. Probenahme		4. Probenahme	
	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung
Erythrozyten ($10^6/\mu\text{L}$)	1,03 ± 0,11	0,99 ± 0,12	0,95 ± 0,08	1,02 ± 0,11
Thrombozyten ($10^4/\mu\text{L}$)	1,30 ± 0,26	1,26 ± 0,30	1,36 ± 0,28	1,32 ± 0,34
Leukozyten ($10^4/\mu\text{L}$)	2,16 ± 0,43	2,39 ± 0,68	2,22 ± 0,55	2,31 ± 0,42
Lymphozyten (%)	97,5 ± 1,3	97,2 ± 2,0	97,0 ± 1,7	97,1 ± 1,7
Granulozyten (%)	1,9 ± 1,2	1,9 ± 1,6	2,2 ± 1,7	2,0 ± 1,3
Monozyten (%)	0,6 ± 0,5	0,9 ± 1,0	0,8 ± 0,6	0,9 ± 0,7
Hämatokrit	33,6 ± 3,8	31,4 ± 3,6	31,9 ± 3,3	31,4 ± 3,5
Leukokrit	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2
Glukose	56,7 ± 4,0	55,0 ± 5,2	56,3 ± 3,2	54,8 ± 4,3
Hämoglobin	10,1 ± 1,0	9,7 ± 1,0	9,8 ± 0,9	9,9 ± 0,9
MCH	98,4 ± 13,0	98,8 ± 7,5	103,2 ± 5,5	97,7 ± 6,9
MCHC	29,9 ± 1,3	31,0 ± 2,5	30,7 ± 2,2	31,7 ± 2,0
MCV	328,5 ± 40,6	319,0 ± 15,5	337,4 ± 24,3	307,9 ± 15,6

MCH = mittlerer Hämoglobin-Gehalt eines einzelnen Erythrozyten.

MCV = mittleres Volumen eines einzelnen Erythrozyten.

MCHC = mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration.

Tabelle 20: Ergebnisse des Regressionsmodell der gewöhnlichen kleinsten Quadrate der hämatologischen Parameter.

		Übersicht der Anpassung			Signifikanz der Modelleffekte				
		Beobachtungen	r ² (korr.)	P - Wert	Kreislauf ^a		Lichtstärke	Zeitpunkt ^b	
Parameter	Erythrozyten	160	0,216	0,0016	n.s.		n.s.	< 0,0001	↓
	Thrombozyten	160	-0,118	0,7406	n.s.		n.s.	n.s.	
	Leukozyten	160	0,216	< 0,0001	n.s.		0,0327	< 0,0001	↓
	Lymphozyten	160	0,019	0,9098	n.s.		n.s.	n.s.	
	Granulozyten	160	-0,021	0,7398	n.s.		n.s.	n.s.	
	Monozyten	160	-0,111	0,1543	n.s.		n.s.	n.s.	
	Hämatokrit	160	0,409	0,0006	0,0338	K	n.s.	< 0,0001	↓
	Leukokrit	150	0,346	0,0319	0,0345	B	n.s.	n.s.	
	Glukose	159	0,230	< 0,0001	n.s.		n.s.	< 0,0001	↓
	Hämoglobin	157	0,149	0,0439	n.s.		n.s.	0,0036	↑
	MCH	157	0,240	< 0,0001	n.s.		n.s.	< 0,0001	↑
	MCHC	157	0,522	< 0,0001	< 0,0001	B	n.s.	< 0,0001	↑
MCV	160	0,163	0,0019	< 0,0001	B	n.s.	n.s.		

^a höhere Werte im Kontrollkreislauf (K) bzw. im Belastungskreislauf (B).

^b Pfeile zeigen Tendenz der Veränderung im Laufe des Untersuchungszeitraums an.

Unterschied zwischen den Kreisläufen

Der Hämatokrit-Wert war bei Fischen des Belastungskreislaufs signifikant niedriger ($P < 0,0338$) als bei Fischen aus dem Kontrollkreislauf (Abbildung 51). Dies wirkte sich auch signifikant auf die MCV- und MCHC-Werte aus: der MCHC-Wert war im Belastungskreislauf signifikant höher als im Kontrollkreislauf ($P < 0,0001$), während der MCV-Wert bei Fischen des Belastungskreislaufs signifikant niedriger war ($P < 0,0001$).

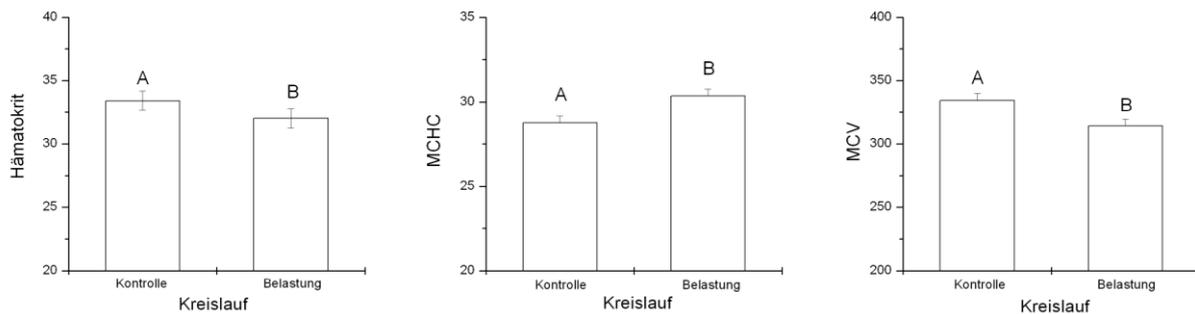


Abbildung 51: Aus dem generellen linearen Modell abgeleitete Mittelwerte \pm StFehler für Hämatokrit, MCHC und MCV. Balken, die nicht über den gleichen Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$).

Zwischen den beiden Kreisläufen zeigte sich auch in Bezug auf den Leukokrit ein signifikanter Unterschied ($P < 0,0345$). So fiel der Leukokrit im Belastungskreislauf geringfügig höher aus als im Kontrollkreislauf (Abbildung 52).

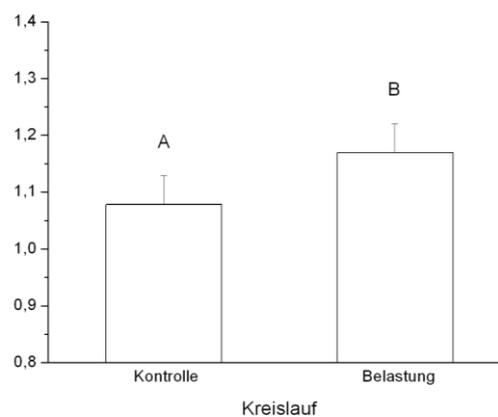


Abbildung 52: Aus dem generellen linearen Modell abgeleitete Mittelwerte \pm StFehler für Leukokrit. Balken, die nicht über den gleichen Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$).

Lichtstärke

Hinsichtlich der unterschiedlichen Lichtstärke zeigte sich bei der Anzahl an Leukozyten ein signifikanter Effekt ($P < 0,0327$). So war die Anzahl an Leukozyten bei einer Beleuchtungsstärke von 50 lux signifikant niedriger ($P < 0,05$) als bei einer Beleuchtungsstärke von 200 lux (Abbildung 53). Zwischen den anderen Lichtstärken wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt ($P > 0,05$).

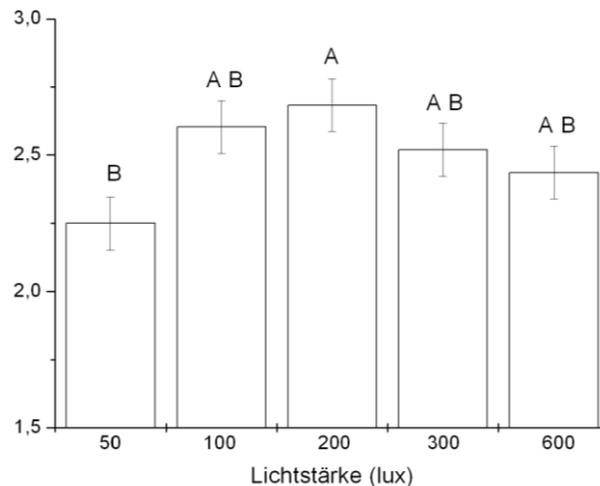


Abbildung 53: Aus dem generellen linearen Modell abgeleitete Mittelwerte \pm StFehler für die Anzahl an Leukozyten. Balken, die nicht über den gleichen Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$).

Zeitpunkt der Probenahme

Der Zeitpunkt der Probenahme hatte einen signifikanten Effekt ($P < 0,0001$) auf die Parameter Anzahl der Erythrozyten, Anzahl der Leukozyten, Hämatokrit und Glukose. So zeigte sich im Laufe des Experiments eine Abnahme dieser Blutwerte. Hingegen wurde bei den Parametern Hämoglobin ($P < 0,0036$), MCH ($P < 0,0001$) und MCHC ($P < 0,0001$) ein signifikanter Anstieg im Laufe der Untersuchung festgestellt. Alle anderen Parameter zeigten im Untersuchungszeitraum keine signifikanten Veränderungen ($P > 0,05$).

Flossenzustand

Flossenerosion

Die Flossenerosion der drei untersuchten Flossentypen (linke und rechte Brustflosse + Rückenflosse), die nach Person-Le Ruyet et al. (2007) bestimmt wurde, ist in Abbildung 54 dargestellt. Mit Hilfe einer ordinal-logistischen Regression (Tabelle 21) wurde überprüft, ob die Lichtstärke, der Zeitpunkt der Beprobung oder der Kreislauf (Kontrolle/Belastung) einen signifikanten Effekt auf den Flossenindex hatte. Es zeigte sich dabei, dass zwischen den Kreisläufen kein signifikanter Unterschied bestand ($P > 0,05$). Auch lag für unterschiedliche Lichtstärken kein signifikanter Effekt ($P > 0,05$) vor. Des Weiteren war im Versuchszeitraum in beiden Kreisläufen keine signifikante Veränderung ($P > 0,05$) der Flossenerosion zu beobachten.

Tabelle 21: Ergebnisse der ordinal-logistischen Anpassung der Flossenerosion.

		Übersicht der Anpassung			Signifikanz der Modelleffekte		
		Beobachtungen	r^2	P - Wert	Kreislauf	Lichtstärke	Zeitpunkt
Parameter	Flossenerosion Rückenflosse	160	0,061	0,0197	n.s.	n.s.	n.s.
	Flossenerosion li. Brustflosse	160	0,034	0,0996	n.s.	n.s.	n.s.
	Flossenerosion re. Brustflosse	160	0,022	0,1762	n.s.	n.s.	n.s.

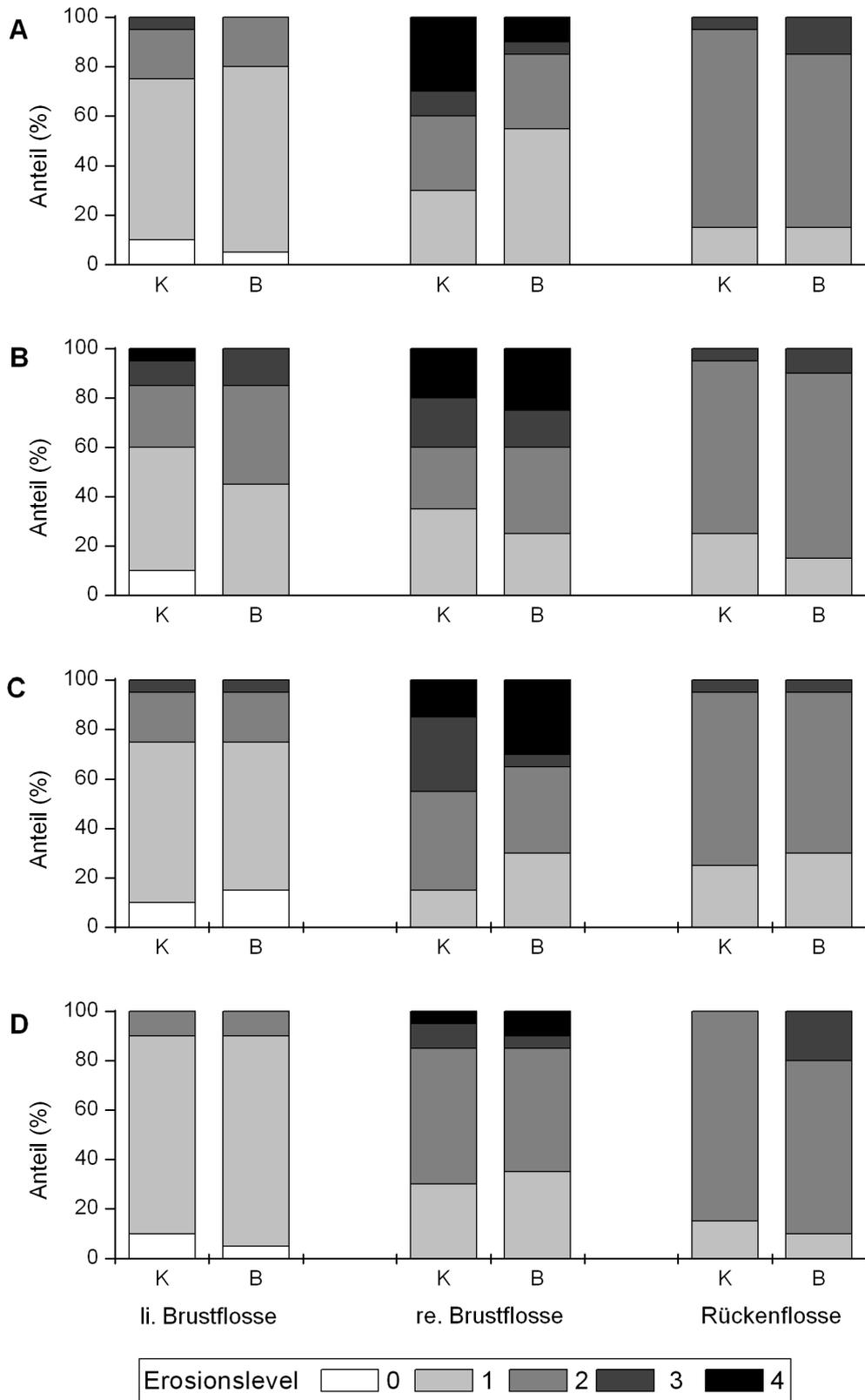


Abbildung 54: Anteile (%) der Flossen-Erosionslevel nach Person-Le Ruyet et al. (2007) zu Beginn (A), nach 5 Wochen (B), nach 10 Wochen (C) und am Ende (D) des Versuchszeitraums. Es wurden pro Zeitpunkt jeweils 20 Regenbogenforellen pro Kreislaufsystem untersucht. K = Kontrollkreislauf; B = Belastungskreislauf.

Flossenindex

In Tabelle 22 sind die Flossenindizes der linken bzw. rechten Brustflosse und Rückenflosse der jeweiligen Probenahmen aufgeführt. Mit Hilfe eines generellen linearen Modells (Tabelle 23) wurde überprüft, ob die Lichtstärke, der Zeitpunkt der Beprobung oder der Kreislauf (Kontrolle/Belastung) einen signifikanten Effekt auf den Flossenindex hatte. Dabei zeigte es sich, dass der Flossenindex aller drei Flossentypen zwischen den beiden Kreisläufen nicht signifikant unterschiedlich war ($P > 0,05$). Auch ergab sich für die unterschiedlichen Lichtbehandlungen kein signifikanter Effekt ($P > 0,05$). Des Weiteren wurde keine signifikante Veränderungen ($P > 0,05$) der Flossenindizes im Laufe des Experiments festgestellt.

Tabelle 22: Flossenindex (Mittelwert \pm StAbw) nach Kindschi (1987).

	1. Probenahme		2. Probenahme	
	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung
<i>n</i>	20	20	20	20
Rückenflosse	8,63 \pm 0,94	8,36 \pm 0,66	8,47 \pm 0,86	9,04 \pm 0,77
Rechte Brustflosse	7,64 \pm 2,34	7,15 \pm 2,63	6,50 \pm 2,00	6,52 \pm 2,40
Linke Brustflosse	9,03 \pm 1,86	8,27 \pm 1,29	8,78 \pm 0,99	8,52 \pm 1,31

	3. Probenahme		4. Probenahme	
	Kontrolle	Belastung	Kontrolle	Belastung
<i>n</i>	20	20	20	20
Rückenflosse	9,02 \pm 0,91	8,64 \pm 0,95	8,52 \pm 0,88	8,18 \pm 1,07
Rechte Brustflosse	7,87 \pm 1,89	7,83 \pm 2,02	5,92 \pm 3,20	7,96 \pm 2,34
Linke Brustflosse	9,23 \pm 0,90	9,32 \pm 0,69	8,64 \pm 1,81	9,04 \pm 1,57

Tabelle 23: Ergebnisse des generellen linearen Modells für den Flossenindex.

		Übersicht der Anpassung			Signifikanz der Modelleffekte		
		Beobachtungen	r^2 (korr.)	<i>P</i> - Wert	Kreislauf	Lichtstärke	Zeitpunkt
Parameter	Flossenindex Rückenflosse	160	0,073	0,4433	n.s.	n.s.	n.s.
	Flossenindex li. Brustflosse	160	-0,006	0,4223	n.s.	n.s.	n.s.
	Flossenindex re. Brustflosse	160	-0,224	0,1547	n.s.	n.s.	n.s.

9.2.5 Bakterielle Belastung

Bakterielle Aktivität

In Abbildung 55 ist die Entwicklung der bakteriellen Aktivität und der Partikelkonzentration im Kontroll- und Belastungskreislauf der ersten drei Versuchswochen und während des gesamten Versuchszeitraums dargestellt. Am Anfang des Versuchs wurden die bakterielle Aktivität alle zwei Tage bestimmt, um die Entwicklung der bakteriellen Belastung bei steigender Partikelkonzentration genauer zu untersuchen. Ab Woche 4 wurden nur noch zweimal wöchentlich Messungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass im Belastungskreislauf bei steigender Partikelkonzentration auch die bakterielle Aktivität anstieg. Insgesamt unterschied sich die bakterielle Aktivität des Kontroll- und Belastungskreislaufs signifikant ($P < 0,0001$) voneinander. Die mit der Bactiquant-Methode gemessene bakterielle Aktivität im Kontrollkreislauf schwankte während des gesamten Versuchs ungefähr zwischen 18.000 und 44.000, was in etwa Werten von Kreislaufanlagen 90 Tage nach der Inbetriebnahme entspricht (Rojas-Tirado et al., 2016). Hingegen stieg die bakterielle Aktivität im Belastungskreislauf innerhalb der ersten drei Wochen bis zum Erreichen einer Partikelkonzentration von über 30 mg/L auf über 200.000 an. Ab Woche 4 schwankte die bakterielle Aktivität im Belastungskreislauf ungefähr zwischen 172.000 und 342.000. Somit war die bakterielle Aktivität im Belastungskreislauf bis zu siebenmal höher als im Kontrollkreislauf. Insgesamt ergab sich dabei zwischen Partikelkonzentration und bakterieller Aktivität eine sehr enge signifikante lineare Korrelation ($P < 0,0001$; $r^2 = 0,98$; Abbildung 56).

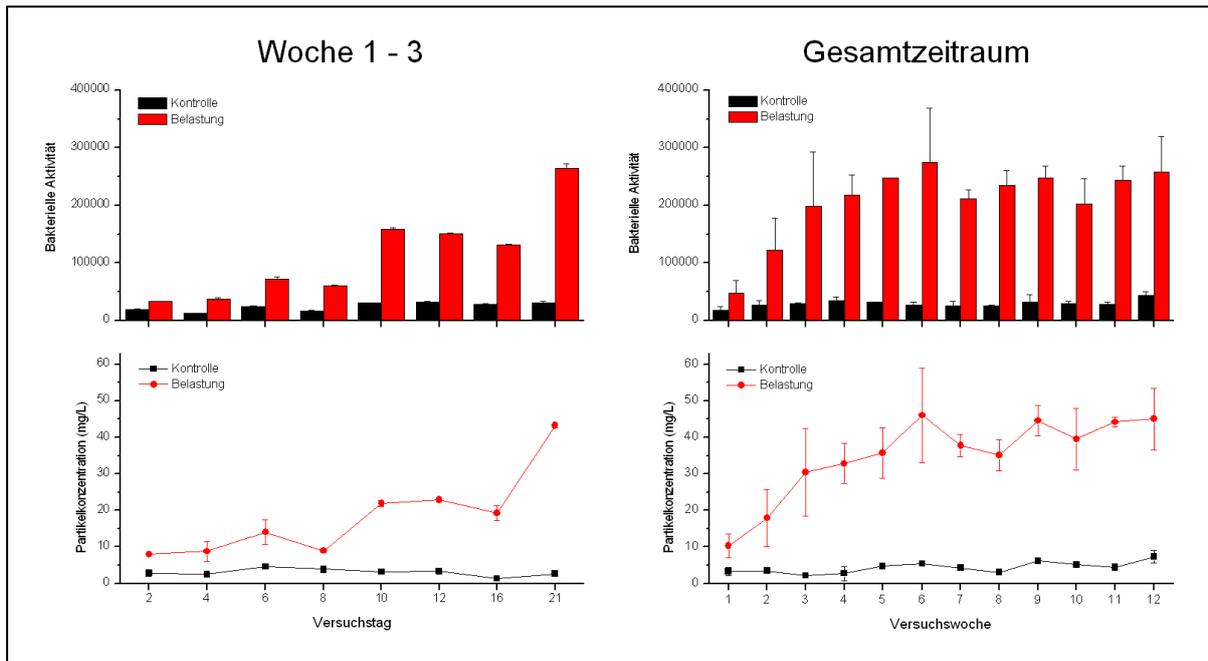


Abbildung 55: Veränderung der bakteriellen Aktivität (Balkendiagramm) und der Partikelkonzentration (Mittelwert \pm StAbw; Punkt-Linien-Diagramm) in den ersten drei Wochen bis zum Erreichen einer Partikelkonzentration von über 30 mg/L und über den Versuchszeitraum.

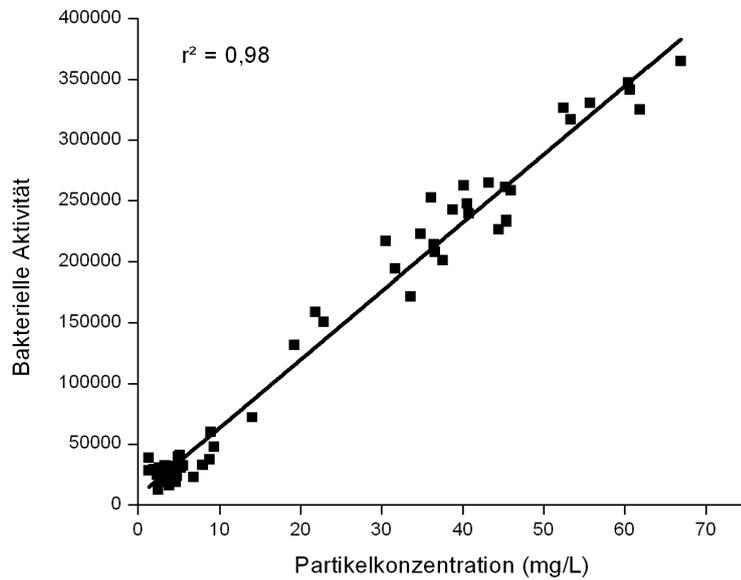


Abbildung 56: Zusammenhang zwischen Partikelkonzentration und bakterieller Aktivität.

In Abbildung 57 ist die Veränderung der bakteriellen Aktivität und der Partikel-Konzentration im Tagesverlauf der Woche 10 dargestellt. Auch hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied bei der bakteriellen Belastung des Anlagenwassers im Kontroll- und Belastungskreislauf. Während die bakterielle Belastung des Kontrollkreislafs im Tagesverlauf nur um ca. 15.000 schwankt, verändert sich diese im Belastungskreislauf um mehr als 120.000.

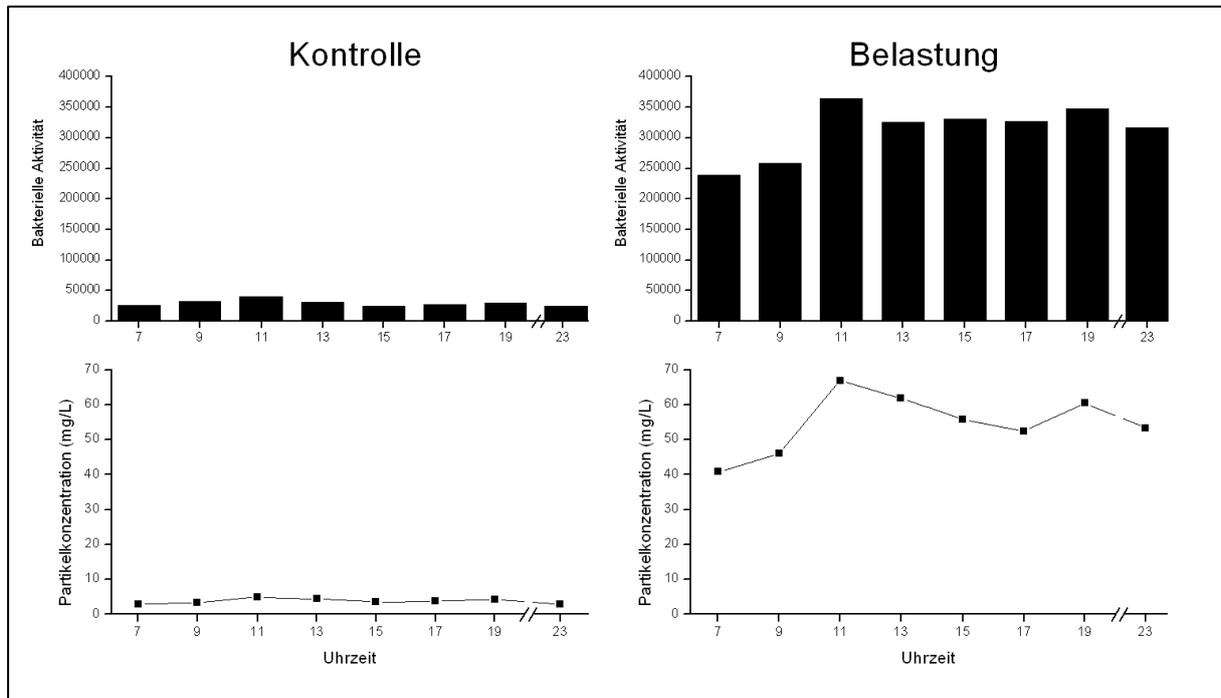


Abbildung 57: Veränderung der bakteriellen Aktivität (Balkendiagramm) und der Partikelkonzentration (Punkt-Linien-Diagramm) des Kontroll- und Belastungskreislaufs im Tagesverlauf von Woche 10.

Bakteriologische Untersuchung durch den Fischgesundheitsdienst Aulendorf

Für die bakteriologische Untersuchung wurden am Ende des Versuchs jeweils 20 Regenbogenforellen pro Kreislauf durch den Fischgesundheitsdienst Aulendorf untersucht. Insgesamt wurde bei Fischen aus beiden Kreisläufen in keinem Fall eine starke bakterielle Belastung gefunden (Abbildung 58). Die Untersuchung der Haut ergab keinerlei Nachweise von Ektoparasiten bzw. Bakterien. Der Direktnachweis von Bakterien an den Kiemen erbrachte bei Fischen des Kontrollkreislafs in zwei Fällen und bei Fischen des Belastungskreislafs in 4 Fällen einen Nachweis des fischpathogenen Bakteriums *Flavobacterium columnare*. Insgesamt konnten bei den Kiemen von Fischen aus dem Belastungskreislauf signifikant mehr Bakterien nachgewiesen werden als im Kontrollkreislauf ($P < 0,01$). Der Unterschied bei der Anzucht fiel jedoch nicht signifikant aus ($P > 0,05$). Bei der bakteriologischen Direktanzucht von Kiemenabstrichen konnte im Belastungskreislauf in drei

Fällen *Aeromonas sobria* nachgewiesen werden. Bei allen anderen Befunden handelte es sich sowohl beim Kontroll- als auch beim Belastungskreislauf um unspezifische Mischkulturen. Bei der Untersuchung der Milzquetschpräparate konnten keine Bakterien nachgewiesen werden, die bakterielle Anzucht erbrachte jedoch eine signifikant höhere Belastung ($P < 0,0001$) bei Fischen aus dem Belastungskreislauf.

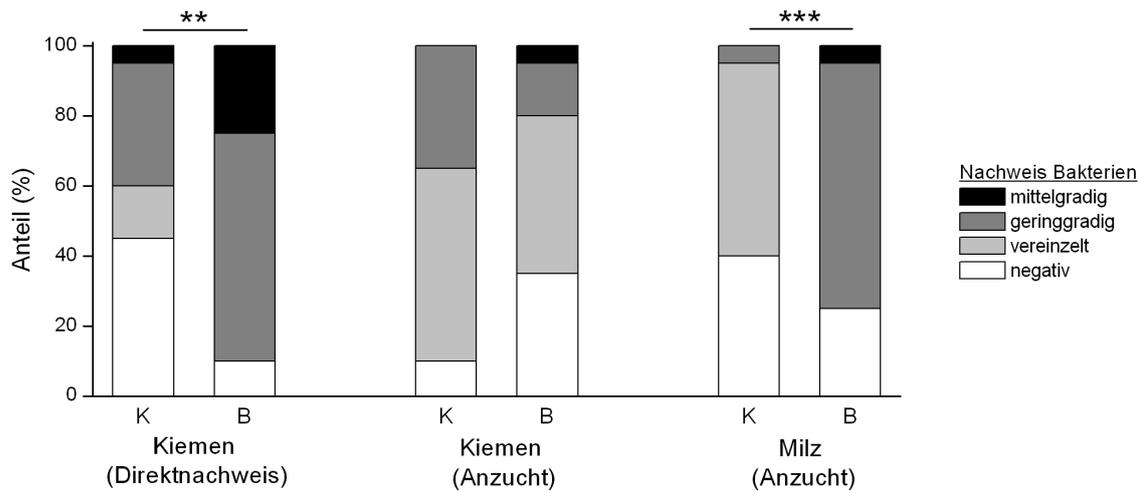


Abbildung 58: Bakteriologische Untersuchung der Kiemen (Direktnachweis und Anzucht) und der Milz (Anzucht) von je 20 Regenbogenforellen des Kontroll- (K) und Belastungskreislaufs (B). ** = signifikanter Unterschied ($P < 0,01$); *** = signifikanter Unterschied ($P < 0,0001$) zwischen den beiden Kreisläufen.

9.3 Diskussion

Auch im abschließenden Versuch wurde eine weitgehende Entkopplung der Partikelbelastung von störenden Wasserparametern erreicht. Gleichzeitig wurde in beiden Kreisläufen die NH_3 -Konzentration gezielt erhöht. Dadurch sollte überprüft werden, ob eine erhöhte Partikelbelastung in Kombination mit einer Fisch-relevanten Belastung durch Ammoniak pathologische Auswirkungen auf die Physiologie und die Leistung von Regenbogenforellen hat. Der Versuch war über drei Stufen so aufgebaut, dass in der ersten Phase nur die Partikelkonzentration im Belastungskreislauf auf über 30 mg/L erhöht wurde. In der zweiten Phase wurde dann zusätzlich die NH_3 -Konzentration durch Erhöhung des pH-Werts und Zugabe von Ammoniumchlorid auf durchschnittlich ca. 0,013 mg/L erhöht und somit der empfohlene Grenzwert von 0,0125 mg/L (Timmons and Ebeling, 2010) erreicht bzw. leicht überschritten. In der dritten Phase wurde die NH_3 -Konzentration auf durchschnittlich über 0,02 mg/L erhöht. Durch den Einsatz des Ammoniumautomaten AMTAX SC und die automatische Anpassung des pH-Werts war eine genaue Überwachung der Ammoniumkonzentration und somit auch der NH_3 -Konzentration möglich. Es zeigte sich, dass in beiden Kreisläufen im Tagesverlauf von Phase 3 NH_3 -Konzentrationen von über 0,04 mg/L erreicht wurden.

Auf Basis der Leistungsparameter der Fische konnten auch bei diesem Versuch keine negativen Auswirkungen der erhöhten Partikelbelastung von über 70 mg/L festgestellt werden. Die Fische zeigten in beiden Kreisläufen beispielsweise exzellentes Wachstum. Auch die Überlebensrate von über 99 % in beiden parallelen Kreislaufanlagen spricht für gute Lebensbedingungen für die Regenbogenforellen und unabhängig von der hohen Partikelkonzentration im Belastungskreislauf. Auch wurde wieder ein verändertes Fressverhalten der Fische im Belastungskreislauf festgestellt.

Die Regenbogenforellen wurden zusätzlich unter unterschiedlicher Beleuchtung gehalten, um zu testen, ob die drastischen Unterschiede in der Trübung sich abhängig von Licht unterschiedlich auswirken. Die durchgeführten Messungen in unterschiedlichen Wassertiefen zeigten auch deutlich die Effekte der unterschiedlichen Partikelfracht. So fiel die Lichtstärke im Belastungskreislauf innerhalb der ersten 10 cm Wassertiefe um bis zu 80 % und betrug in 40 cm Wassertiefe nur noch 0,3 bis 2,4 lux. Dies entspricht in der Natur ungefähr der Lichtstärke von Mondlicht, was u.a. beim Atlantischen Lachs bereits zu einer

deutlichen Reduzierung der Fressaktivität führen kann (Fraser und Metcalfe, 1997). Dies wurde für Regenbogenforellen bei diesem Versuch jedoch nicht beobachtet, es kam lediglich zu einer zeitlichen Verzögerung bei der Aufnahme des Futters. So stellten Noble et al. (2005) zwischen Lichtintensitäten von 50 bzw. 700 lux an der Wasseroberfläche auch keinen Unterschied bei dem Verlust von Futter fest. Im Kontrollkreislauf fiel die Reduzierung der Lichtstärke mit zunehmender Wassertiefe am Anfang des Versuchs nicht so stark aus, reduzierte sich im Laufe des Versuchs aufgrund der Braunfärbung des Wassers jedoch deutlich. Insgesamt wurden bei den Gesundheitsparametern jedoch keine großen Unterschiede aufgrund der Lichtstärke festgestellt. Der einzige signifikante Effekt zeigte sich bei der Anzahl an Leukozyten, wo bei einer niedrigen Lichtstärke von 50 lux bei den Fischen eine signifikant geringere Anzahl an Leukozyten festgestellt wurde als bei einer Lichtstärke von 200 lux. Bei der Riesenscheibenbrasse (*Megalobrama amblycephala*) konnte gezeigt werden, dass sich sowohl niedrige (100 lux) als auch hohe Lichtintensität (1600 lux) negativ auf die Krankheitsresistenz auswirkt und die besten Wachstumsergebnisse bei 400 lux erreicht wurden (Tian et al., 2015). In Bezug auf Regenbogenforellen sind keine vergleichbaren Ergebnisse aus der Literatur bekannt, sie scheint aber aufgrund der vorliegenden Studie sehr robust gegen unterschiedliches Lichtregime zu sein.

Bei der hämatologischen Untersuchung der Regenbogenforellen zeigte sich, dass der Zeitpunkt der Probenahme bei einigen Parametern einen signifikanten Effekt hatte. Dies ist zum einen damit zu erklären, dass es zu einer Veränderung der hämatologischen Parameter mit steigendem Alter oder allgemein zu zeitlichen Schwankungen des Blutbilds kommen kann (Denton and Yousef, 1975; Haider, 1971, 1973); Pund, 1997). Des Weiteren zeigte sich zwischen den Kreisläufen ein signifikanter Unterschied bei den Parametern Hämatokrit, MCHC und MCV. Diese Unterschiede zeigten sich auch schon im Langzeitversuch. Insgesamt sind die Ergebnisse der Hämatologie jedoch im Rahmen von anderen Untersuchungen (McCarthy et al., 1973; Pund, 1997; Řehulka et al., 2004) und deuten keine Pathologie an.

Auch die Flossen der Regenbogenforellen zeigten keine Effekte in Bezug auf die Partikelfracht zwischen Fischen aus dem Kontroll- und Belastungskreislauf. Es war außerdem in beiden Kreisläufen keine Verschlechterung der Flossenstrukturen im Laufe des Versuchs zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass sich auch die erhöhten NH_3 -Werte nicht grundsätzlich negativ auf den Flossenzustand der Regenbogenforellen ausgewirkt haben.

Die Messung der bakteriellen Belastung zeigte eine deutlich höhere bakterielle Aktivität in der Kreislaufanlage mit erhöhter Partikelbelastung. Im Tagesverlauf war die bakterielle Belastung hohen Schwankungen ausgesetzt war. Dabei war ein enger Zusammenhang zwischen Partikelbelastung und bakterieller Aktivität festzustellen. Es ist bekannt, dass Bakterien häufig an Partikel angeheftet sind und diese als Substrat nutzen (Kirchman & Ducklow, 1987), so dass eine erhöhte Partikelbelastung in der Regel gleichzeitig auch ein erhöhtes Potenzial von bakteriellen Infektionen bedeutet. Durch ausreichende Desinfektions-Maßnahmen, wie z.B. im vorliegenden Fall durch UV-Bestrahlung, kann der bakteriellen Belastung jedoch entgegengewirkt werden. So wurde anhand der bakteriologischen Untersuchung durch den Fischgesundheitsdienst Aulendorf bei Regenbogenforellen beider Kreisläufe nur eine moderate bakterielle Belastung festgestellt. Es zeigte sich aber auch in diesem Versuch, dass die untersuchte bakterielle Belastung auf den Kiemen und in der Milz bei Fischen aus dem Kreislauf mit erhöhter Partikelkonzentration im Vergleich zu Fischen aus dem Kontrollkreislauf erhöht war.

Somit zeigen insgesamt auch die Ergebnisse des vorliegenden Doppelbelastungsversuchs, dass auch bei erhöhter NH_3 -Konzentration bis auf eine leicht erhöhte bakterielle Belastung keine negativen Auswirkungen der Partikelbelastung auf die Physiologie der Regenbogenforellen festzustellen waren. Zudem wirkte sich die unterschiedliche Lichtverfügbarkeit nicht auf die Leistung und das messbare Wohlbefinden der Regenbogenforellen aus. Der bisher postulierte negative Einfluss der Partikelbelastung auf die Fischgesundheit ist somit nach den vorliegenden Daten nicht gegeben. Die bisherige Einschätzung dürfte darauf beruhen, dass hohe TSS-Konzentration gleichzeitig mit anderen potentiell belastenden Parametern auftritt und somit eine Scheinkorrelation suggeriert.

10 Fazit

Vor Beginn dieses Projekts wurde davon ausgegangen, dass sich hohe Partikelkonzentrationen in Kreislaufanlagen negativ auf die Physiologie und die Wachstumsleistung von Salmoniden auswirken. In Bezug auf Partikelkonzentrationen wurde bisher 25 mg/L als gängiger Grenzwert genannt. Auf dieser Basis waren entsprechend die Versuche in diesem Projekt zunächst konzipiert. Es zeigte sich jedoch in allen durchgeführten Experimenten, dass insgesamt keine gravierenden Auswirkungen der Partikelbelastung bis zu einer Konzentration von über 70 mg/L festzustellen waren, also Partikelbelastungen, die in der Fischzucht in aller Regel nicht zu erwarten sind. Bei der bakteriellen Belastung des Anlagenwassers war eine deutliche Erhöhung im Belastungskreislauf festzustellen, dieser Belastung kann jedoch effektiv z.B. durch den Einsatz von UV-Bestrahlung entgegengewirkt werden. Auch wurde durch die erhöhte Partikelkonzentration im Belastungskreislauf ein verändertes Fressverhalten bei den Fischen beobachtet. So zeigte sich eine deutlich verzögerte Futteraufnahme bei Fischen aus dem Belastungskreislauf, was unter kommerziellen Bedingungen und beim Einsatz von Futterautomaten möglicherweise zu Futtermitteln führen kann.

Insbesondere wurden negative Auswirkungen der hohen Partikelbelastung auf die exponierten und empfindlichen Kiemenstrukturen erwartet. Es zeigten sich jedoch keine negativen Effekte, z.T. waren die Kiemenstrukturen der Fische bei hoher Partikelbelastung sogar in einem besseren Zustand als bei Fischen aus dem Kontrollkreislauf. Die Formanalyse der Partikel zeigt, dass es sich bei den Partikeln in Kreislaufanlagen hauptsächlich um flockenförmige Partikel handelt, die weder scharfkantige noch eckige Strukturen aufweisen. Dies ist auf den organischen Ursprung (Fischkot, Futterreste) dieser Partikel zurückzuführen. Somit haben die Partikel in Kreislaufanlagen insgesamt kein so hohes Schadenspotential wie z.B. mineralische Schwebstoffe nach Starkregenereignissen in Durchflussanlagen oder der freien Wildbahn.

Die Ergebnisse dieses Projekts sollten eigentlich nach Abschluss des Projekts in Form eines Leitfadens Fischzüchtern zur Verfügung gestellt werden und praxisorientierte Empfehlungen zur Optimierung des Schwebstoffmanagements liefern. Da aber im Zuge dieses Projekts keine negativen Auswirkungen realistischer Partikelbelastung festzustellen waren, ist dies obsolet. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden jedoch in Fachveranstaltungen vorgestellt und

diskutiert. Außerdem werden die Ergebnisse in der Schriftenreihe „Aquakultur und Fischereinformationen“ der Fischereiforschungsstelle Baden-Württemberg und Fachzeitschriften veröffentlicht.

11 Veröffentlichung/Verbreitung

Fachpublikationen

Cornelius Becke, Dieter Steinhagen, Mark Schumann und Alexander Brinker
Physiological consequences for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of short-term exposure to increased suspended solid load. Aquacultural Engineering (2017)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2016.11.001>

Cornelius Becke, Mark Schumann, Dieter Steinhagen, Bettina Schletz, Alexander Brinker und Jürgen Geist
Long-term exposure to suspended solid load over 30 mg/L: physiological consequences for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in recirculating aquaculture systems (in prep.)

Cornelius Becke, Mark Schumann, Alexander Brinker und Jürgen Geist
Shape Analysis of suspended solids in recirculating aquaculture systems (in prep.)

Cornelius Becke, Mark Schumann, Dieter Steinhagen, Paula Andrea Rojas-Tirado, Alexander Brinker und Jürgen Geist
Effects of increased suspended solid load on the physiology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) accompanied by an elevated ammonia concentration (in prep.)

Vorträge/Poster

- 11 / 2016 **Vortrag:** Becke C., Schumann M., Steinhagen D., Schletz B., Brinker A.:
Auswirkungen von Schwebstoffbelastung auf Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) in Kreislaufanlagen. Fachforum Forellenzucht Baden-Württemberg, Geisingen
- 11 / 2016 **Vortrag:** Becke C., Schumann M., Steinhagen D., Schletz B., Brinker A.:
Schwebstoffe in Kreislaufanlagen: Auswirkungen auf das Wachstum und die Physiologie von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Kolloquiumsreihe des Instituts für Seenforschung, Langenargen
- 10 / 2016 **Vortrag:** Becke C., Schumann M., Steinhagen D., Schletz B., Brinker A.:
Auswirkungen von Partikelbelastung in Kreislaufanlagen auf die Physiologie von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). XVI. Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektion der European Association of Fish Pathologists, Graz, Österreich
- 08 / 2016 **Poster:** Becke C., Schumann M., Steinhagen D., Schletz B., Brinker A.:
Schwebstoffe in der Fischzucht: Auswirkungen auf die Physiologie von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Deutscher Fischereitag, Potsdam
(**2. Platz Posterpreis**)

- 08 / 2016 **Vortrag:** Becke C., Schumann M., Steinhagen D., Schletz B., Brinker A.: Consequences of short- and long-term exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increased suspended solid load in recirculating aquaculture systems. 11th International Conference on Recirculating Aquaculture, Roanoke, USA
- 01 / 2016 **Vortrag:** Becke C., Schumann M., Steinhagen D., Brinker A.: Auswirkungen von erhöhter Partikelbelastung in Kreislaufanlagen auf die Gesundheit und Wachstumsleistung von Regenbogenforellen. Fortbildungstagung für Fischhaltung und Fischzucht, Starnberg
- 09 / 2015 **Vortrag:** Becke C., Schumann M., Brinker A.: First findings on the effects of suspended solids in recirculating trout aquaculture on selected health parameters. 3rd NordicRAS Workshop on Recirculating Aquaculture Systems, Molde, Norwegen

Auszeichnung

Wilhelm Schäperclaus-Förderpreis für den besten Vortrag bei der XVI.

Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektion der European Association of Fish Pathologists, Graz, Österreich

Danksagung

Wir bedanken uns herzlich bei allen beteiligten Personen und Institutionen, die durch ihre Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieses Projekts beigetragen haben.

Großer Dank gilt Helga Bentele für ihre zuverlässige Arbeit bei der Wasseranalytik und Hans-Peter Billmann für die Unterstützung bei der Betreuung der Versuchsanlage.

Des Weiteren möchten wir uns ganz herzlich bei Professor Dieter Steinhagen für die Beurteilung der histologischen Kiemenschnitte bedanken.

Professor Jürgen Geist danken wir für hilfreiche und weiterführende Diskussionen.

Für die Einführung in die hämatologischen Untersuchungsmethoden danken wir Franz-Josef Stürenberg ganz herzlich.

Des Weiteren danken wir Frauke Lüddeke für Ihre Hilfe und Unterstützung bei der Etablierung des Plattenverfahrens zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten.

Wir danken dem Fischgesundheitsdienst Aulendorf für die Herstellung der histologischen Schnitte der Kiemen und Bettina Schletz für die Beurteilung der bakteriellen Belastung der Fische.

Für die Messung der Yttriumoxid-Proben bedanken wir uns beim Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Sigmaringen.

12 Literatur

- Alabaster, J.S., Lloyd, D.S., 1982. Finely divided solids, in: *Water Quality Criteria for Freshwater Fish*. Butterworth, London, pp. 1–20.
- Au, D.W.T., Pollino, C.A., Shin, P.K.S., Lau, S.T.F., Tang, J.Y.M., 2004. Chronic effects of suspended solids on gill structure, osmoregulation, growth, and triiodothyronine in juvenile green grouper *Epinephelus coioides*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 266, 255–264.
- Awata, S., Tsuruta, T., Yada, T., Iguchi, K., 2011. Effects of suspended sediment on cortisol levels in wild and cultured strains of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Aquaculture* 314, 115–121. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.01.024
- Ayer, N.W., Tyedmers, P.H., 2009. Assessing alternative aquaculture technologies: life cycle assessment of salmonid culture systems in Canada. *J. Clean. Prod.* 17, 362–373. doi:10.1016/j.jclepro.2008.08.002
- Badiola, M., Mendiola, D., Bostock, J., 2012. Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquac. Eng.* 51, 26–35. doi:10.1016/j.aquaeng.2012.07.004
- Bash, J., Berman, C.H., Bolton, S., 2001. Effects of turbidity and suspended solids on salmonids. University of Washington Water Center.
- Bilotta, G.S., Brazier, R.E., 2008. Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Res.* 42, 2849–2861. doi:10.1016/j.watres.2008.03.018
- Blancheton, J.P., Attramadal, K.J.K., Michaud, L., d'Orbcastel, E.R., Vadstein, O., 2013. Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquac. Eng., Workshop on Recirculating Aquaculture Systems* 53, 30–39. doi:10.1016/j.aquaeng.2012.11.009
- Brämick, U., 2016. Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2015. <http://www.ifb-potsdam.de/de-de/veroeffentlichungen/downloads.aspx>
- Brinker, A., Schröder, H.G., Rösch, R., 2005. A high-resolution technique to size suspended solids in flow-through fish farms. *Aquac. Eng.* 32, 325–341. doi:10.1016/j.aquaeng.2004.07.002
- Bruton, M.N., 1985. The effects of suspensoids on fish. *Hydrobiologia* 125, 221–241. doi:10.1007/BF00045937
- Casillas, E., Smith, L.S., 1977. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.* 10, 481–491.
- Chapman, P.M., Popham, J.D., Griffin, J., Leslie, D., Michaelson, J., 1987. Differentiation of physical from chemical toxicity in solid waste fish bioassays. *Water. Air. Soil Pollut.* 33, 295–308.
- Chen, S., Malone, R.F., 1991. Suspended solids control in recirculating aquacultural systems, in: *Engineering Aspects of Intensive Aquaculture, Proceedings from the Aquaculture Symposium*. Ithaca, NY, pp. 170–186.

- Chen, S., Timmons, M.B., Aneshansley, D.J., Bisogni, J.J., 1993. Suspended solids characteristics from recirculating aquacultural systems and design implications. *Aquaculture* 112, 143–155. doi:10.1016/0044-8486(93)90440-A
- Chen, Y.-S., Beveridge, M.C.M., Telfer, T.C., Roy, W.J., 2003. Nutrient leaching and settling rate characteristics of the faeces of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the implications for modelling of solid waste dispersion. *J. Appl. Ichthyol.* 19, 114–117.
- Cho, C.Y., 1992. Feeding systems for rainbow trout and other salmonids with reference to current estimates of energy and protein requirements. *Aquaculture* 100, 107–123.
- Davidson, J., Good, C., Welsh, C., Brazil, B., Summerfelt, S., 2009. Heavy metal and waste metabolite accumulation and their potential effect on rainbow trout performance in a replicated water reuse system operated at low or high system flushing rates. *Aquac. Eng.* 41, 136–145. doi:10.1016/j.aquaeng.2009.04.001
- Denton, J.E., Yousef, M.K., 1975. Seasonal changes in hematology of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 51, 151–153. doi:10.1016/0300-9629(75)90428-4
- Drabkin, D.L., Austin, J.H., 1932. Spectrophotometric Studies I. Spectrophotometric Constants for Common Hemoglobin Derivatives in Human, Dog, and Rabbit Blood. *J. Biol. Chem.* 98, 719–733.
- Ellis, T., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.* 61, 493–531. doi:10.1006/jfbi.2002.2057
- FAO (Ed.), 2016. Contributing to food security and nutrition for all, The state of world fisheries and aquaculture. Rome.
- Fraser, N.H.C., Metcalfe, N.B., 1997. The costs of becoming nocturnal: feeding efficiency in relation to light intensity in juvenile Atlantic salmon. *Funct. Ecol.* 11, 385–391.
- Haider, G., 1973. Hämatologische beobachtungen an regenbogenforellen (*Salmo gairdneri* Rich.) VII. Färbeindex (FI), absoluter Hämoglobingehalt des Einzelerythrozyten (HbE) and mittlere Hämoglobinkonzentration des Einzelerythrozyten (MCHC). *Hydrobiologia* 41, 57–76.
- Haider, G., 1971. Hämatologische Untersuchungen an Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri* Richardson) IV. Erythrozytenzahl und Hämatokrit. *Hydrobiologia* 37, 457–472.
- Hilton, J.W., Atkinson, J.L., Slinger, S.J., 1983. Effect of increased dietary fiber on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40, 81–85.
- Humborstad, O., Jørgensen, T., Grotmol, S., 2006. Exposure of cod *Gadus morhua* to resuspended sediment: an experimental study of the impact of bottom trawling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 309, 247–254. doi:10.3354/meps309247
- Iwama, G.K., Thomas, P.T., Forsyth, R.B., Vijayan, M.M., 1998. Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 8, 35–56.
- Jobling, M., 2003. The thermal growth coefficient (TGC) model of fish growth: a cautionary note. *Aquac. Res.* 34, 581–584. doi:10.1046/j.1365-2109.2003.00859.x
- Kemp, P., Sear, D., Collins, A., Naden, P., Jones, I., 2011. The impacts of fine sediment on riverine fish. *Hydrol. Process.* 25, 1800–1821. doi:10.1002/hyp.7940

- Kindschi, G.A., 1987. Method for Quantifying Degree of Fin Erosion. *Progress. Fish-Cult.* 49, 314–315. doi:10.1577/1548-8640(1987)49<314:MFQDOF>2.0.CO;2
- Kirchman, D.L., Ducklow, H.W., 1987. Trophic dynamics of particle-bound bacteria in pelagic ecosystems: a review, in: *Detritus and Microbial Ecology in Aquaculture*. ICLARM Conference Proceedings. pp. 54–82.
- Klinger, D., Naylor, R., 2012. Searching for Solutions in Aquaculture: Charting a Sustainable Course. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 37, 247–276. doi:10.1146/annurev-environ-021111-161531
- Lake, R.G., Hinch, S.G., 1999. Acute effects of suspended sediment angularity on juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 862–867.
- Limsuwan, C., Limsuwan, T., Grizzle, J.M., Plumb, J.A., 1983. Stress response and blood characteristics of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after anesthesia with etomidate. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40, 2105–2112.
- Ling, J., Chen, S., 2005. Impact of organic carbon on nitrification performance of different biofilters. *Aquac. Eng.* 33, 150–162. doi:10.1016/j.aquaeng.2004.12.002
- Martins, C.I.M., Eding, E.H., Schneider, O., Rasmussen, R., Olesen, B., Plesner, L., Verreth, J.A.J., 2005. Recirculation aquaculture systems in Europe. CONSENSUS, Oostende, Belgium, Consensus Working Group. European Aquaculture Society.
- McCarthy, D.H., Stevenson, J.P., Roberts, M.S., 1973. Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J. Fish Biol.* 5, 1–8.
- McMillan, J.D., Wheaton, F.W., Hochheimer, J.N., Soares, J., 2003. Pumping effect on particle sizes in a recirculating aquaculture system. *Aquac. Eng.* 27, 53–59. doi:10.1016/S0144-8609(02)00038-9
- Natt, M.P., Herrick, C.A., 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult. Sci.* 31, 735–738.
- Noble, C., Mizusawa, K., Tabata, M., 2005. Does light intensity affect self-feeding and food wastage in group-held rainbow trout and white-spotted charr? *J. Fish Biol.* 66, 1387–1399.
- Patterson, R.N., Watts, K.C., 2003. Micro-particles in recirculating aquaculture systems: particle size analysis of culture water from a commercial Atlantic salmon site. *Aquac. Eng.* 28, 99–113. doi:10.1016/S0144-8609(03)00003-7
- Person-Le Ruyet, J., Le Bayon, N., Gros, S., 2007. How to assess fin damage in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*? *Aquat. Living Resour.* 20, 191–195. doi:10.1051/alr:2007031
- Pund, R.P., 1997. Anwendung hämatologischer Untersuchungsmethoden für Fischblut und Beeinflussung des Blutbildes von Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) durch Haltungs- und Umwelteinflüsse sowie endogene Faktoren. Freie Universität Berlin.
- Reeslev, M., Nielsen, J., Rogers, L., 2011. Assessment of the bacterial contamination and remediation efficacy after flooding using fluorometric detection, in: *Surface and Dermal Sampling*. ASTM International.

- Řehulka, J., Minařík, B., Řehulková, E., 2004. Red blood cell indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. *Aquac. Res.* 35, 529–546. doi:10.1111/j.1365-2109.2004.01035.x
- Roberts, R.J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y.Y., 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review: Heat shock proteins in fish and shellfish. *J. Fish Dis.* 33, 789–801. doi:10.1111/j.1365-2761.2010.01183.x
- Robertson, M.J., Scruton, D.A., Clarke, K.D., 2007. Seasonal Effects of Suspended Sediment on the Behavior of Juvenile Atlantic Salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 136, 822–828. doi:10.1577/T06-164.1
- Rojas-Tirado, P., Pedersen, P.B., Pedersen, L.-F., 2016. Bacterial activity dynamics in the water phase during start-up of recirculating aquaculture systems. *Aquac. Eng.* doi:10.1016/j.aquaeng.2016.09.004
- Romeis, B., 1968. *Mikroskopische Technik*, 16th ed. Oldenbourg Publ., Munich, Germany.
- Soivio, A., Nyholm, K., Huhti, M., 1977. Effects of anaesthesia with MS 222, neutralized MS 222 and benzocaine on the blood constituents of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol.* 10, 91–101.
- Sung, Y.Y., MacRae, T.H., 2013. Heat Shock Proteins and Disease Control in Aquatic Organisms. *J. Aquac. Res. Dev.* 01. doi:10.4172/2155-9546.S2-006
- Sutherland, A.B., Maki, J., Vaughan, V., 2008. Effects of Suspended Sediment on Whole-Body Cortisol Stress Response of Two Southern Appalachian Minnows, *Erimonax Monachus* and *Cyprinella Galactura*. *Copeia* 2008, 234–244. doi:10.1643/CP-07-092
- Tavares-Dias, M., Oliveira, S.R., 2009. A review of the blood coagulation system of fish. *Rev. Bras. Biociências* 7.
- Tian, H.-Y., Zhang, D.-D., Xu, C., Wang, F., Liu, W.-B., 2015. Effects of light intensity on growth, immune responses, antioxidant capability and disease resistance of juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. *Fish Shellfish Immunol.* 47, 674–680. doi:10.1016/j.fsi.2015.08.022
- Timmons, M.B., Ebeling, J.M., 2010. *Recirculating Aquaculture*, 2nd ed. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY.
- Turnbull, J., Bell, A., Adams, C., Bron, J., Huntingford, F., 2005. Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. *Aquaculture* 243, 121–132. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.09.022
- Wedemeyer, G.A., 1996. *Physiology of Fish in Intensive Culture Systems*. Springer US, Boston, MA.
- Wong, C.K., Pak, I.A.P., Jiang Liu, X., 2013. Gill damage to juvenile orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) following exposure to suspended sediments. *Aquac. Res.* 44, 1685–1695. doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03173.x
- Yamashita, M., Yabu, T., Ojima, N., 2010. Stress Protein HSP70 in Fish. *Aqua-Biosci. Monogr.* 3, 111–141. doi:10.5047/absm.2010.00304.0111