

# Schlußbericht



## Marines Zooplankton als Grundlage einer nachhaltigen, ressourcenschonenden Fischfütterung (ZoNaFi)

Aktenzeichen: 34533/01-34

Projektlaufzeit: 15.04.2019 – 30.05.2023

Büsum, 2023

Bewilligungsempfänger:



Dr. Sebastian Lippemeier

Hafentörn 3, 25761 Büsum

Kooperationspartner:



Sofia Afoncheva (Doktorandin)

Dr. Andreas Kunzmann (Mentor)

Fahrenheitstraße 6, 28359 Bremen



Beeke K. Röhe (Doktorandin)

Prof. Dr. Carsten Schulz (Mentor)

Hafentörn 3, 25761 Büsum

Fraunhofer-Einrichtung für  
Individualisierte und Zellbasierte  
Medizintechnik IMTE

## INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung .....	1
Material und Methoden .....	3
Bluebiotech .....	3
untersuchte Algenarten .....	3
Kultivierung.....	4
Licht-,Temperatur- und pH-Regime .....	6
Messtechniken .....	7
ZMT .....	8
Isolierung von vermuteten Desaturase- und Elongase-Genen aus <i>A. panamensis</i> .....	10
Funktionelle Charakterisierung der Desaturasen und Elongasen von <i>A. panamensis</i> .....	11
Fettsäure-Analyse .....	12
IMTE .....	12
Goldbrasse ( <i>Sparus aurata</i> ) und angewandte Fütterungsregime .....	12
Versuchsanlage und Durchführung der Larvenversuche .....	13
Lebendfutterkultivierung und -züchtung während des Larvenversuchs .....	16
Beprobung für die Erhebung der Merkmale .....	16
Ergebnisse.....	18
Bluebiotech .....	18
Wachstum.....	18
Optimierung des Mediums .....	20
Temperaturbedingungen .....	26
Korrelation zwischen ZellZahl und Optischer Dichte.....	28
Lagerfähigkeit der 3 ausgewählten Algenarten im Kühlschrank .....	29
Untersuchungen zur Lagerfähigkeit von <i>Rhodomonas</i> sp. ....	32
Downstream und Lagerfähigkeit von <i>Rhodomonas</i> konzentraten.....	36
Upscale der DownstreamProzesse.....	44
ZMT .....	47
Methyl-End-Desaturasen .....	47
Front-End-Desaturasen .....	48
Fett-Acyl-Elongasen .....	50
Alternative Futtermittel für <i>Apocyclops panamensis</i> .....	51
Fettsäureprofile von <i>Apocyclops panamensis</i> .....	57
Fütterungsversuch mit Doraden-Fischlarven in der GMA .....	59
Experiment zur Entnahme von Nauplien .....	62
Experiment zur Entnahme von Copepoditen .....	63
IMTE .....	66

Versuchsaufbau und Zusammenfassung des ersten Versuchs (Kurzbezeichnung: Nutriola, genehmigt von Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein, Referat Tierschutz unter dem Zeichen V 24 – 39894/2020).....	66
Versuchsaufbau und Zusammenfassung des zweiten Versuchs (Kurzbezeichnung: Optipode genehmigt von Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein, Referat Tierschutz unter dem Zeichen V 242 – 40658/2020) .....	72
Versuchsaufbau und Zusammenfassung des dritten Versuchs (Kurzbezeichnung: Nutrilarva genehmigt von Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein, Referat Tierschutz unter dem Zeichen V 244 – 68534/2021) .....	75
Öffentlichkeitsarbeit .....	82
Fazit .....	83
Literatur .....	86

## EINLEITUNG

---

Aufgrund des ständig steigenden weltweiten Bedarfs nach hochwertigem Fisch bei gleichzeitig stagnierenden Fangzahlen in der Fischerei gewinnt die Aquakultur, insbesondere die Produktion von gesunden und vitalen Setzlingen, zunehmend an Bedeutung. Mit durchschnittlichen Überlebensraten in der kommerziellen Setzlingsproduktion mariner Fischlarven von ca. 20-30% ist in den letzten Jahren auch für die in der Aquakultur inzwischen etablierten Arten noch kein wirklicher Durchbruch erzielt worden. Dies lässt sich auch dadurch begründen, dass unser Wissen zum Fressverhalten und zur Verdauungsphysiologie vieler Fischlarvenarten sehr begrenzt ist (Rønnestad et al., 2013; Hamre et al., 2013). Tiefere Erkenntnisse zu diesen wichtigen Aufzuchtphasen sind deshalb aus tierschutzrechtlichen, ethischen und wirtschaftlichen Gründen dringend notwendig. Während der Larvenentwicklungszeit, in der Fische eine massive Entwicklung durchlaufen, sind hohe Wachstumsraten zu beobachten und Gewebe und Organsysteme beginnen sich zu differenzieren (Salem et al., 2021). Dabei spielt die Fütterung eine bedeutende Rolle, da sie zahlreiche Merkmale wie Wachstumsrate, Überlebensrate, Larvenkonditionierung und vor allem das Tierwohl beeinflusst. Das bedeutet, die Larven müssen ein ernährungsphysiologisch ausgewogenes und leicht verdauliches Lebendfutter (Rotatorien, Copepoden, Artemien, usw.) erhalten, insbesondere in den frühen Entwicklungsphasen. Sobald Verdauungsenzyme nachweisbar sind, sind die Larven bereit, Trockenfutter aufzunehmen (Rønnestad et al., 2013; Salem et al., 2021). Zur Optimierung der Larvenproduktion ist daher ein grundlegendes Verständnis des physiologischen Verdauungsprozesses der Larven erforderlich, um den optimalen altersspezifischen Nährstoff- und Nahrungsbedarf zu bestimmen. Da es gegenwärtig insbesondere für Larvenstadien mariner Fischarten noch keine mikropartikulären Futtermittel (MD) gibt, welche das Lebendfutter bei der initialen Fütterung vollständig ersetzen kann, bleibt die Erstfütterung mit Rotatorien und/oder Artemia-Nauplien in kommerziellen Brutbetrieben eine gängige Praxis (Dhont et al. 2013; Conceição et al., 2010; Cahu and Zambonino-Infante, 2001; Fernández-Díaz and Yúfera, 1997). Die Fütterung mit Rotatorien und Artemia-Nauplien ist aber nicht nur kostenintensiv in der Produktion, sondern diese Organismen benötigen zudem eine Anreicherung mit z.B. Fettsäuren, um eine Nährstoffqualität entsprechend der natürlichen Nahrung der Fischlarven zu erreichen (Dhont et al., 2013; Conceição et al., 2010; Aragão et al., 2004; Støttrup et al. 1986). Im Vergleich zu diesem Fütterungsregime erreicht man in der Regel mit Copepodennauplien als naturnahe Nahrungsorganismen deutlich höhere Überlebensraten und ein besseres Wachstum (Koedijk et al., 2010; Busch et al., 2010; Hamre et al., 2008; Imsland et al., 2006; Evjemo et al., 2003;

Støttrup 2000; Shields et al., 1999). Der Hauptvorteil einer Copepodenfütterung gegenüber anderen Lebendfüttermitteln wie Rotatorien oder Artemien ist die Fähigkeit der Copepoden, essentielle Omega-3-Fettsäuren, insbesondere wichtige hochungesättigte Fettsäuren (HUFAs) wie Eicosapentaensäure (EPA, 20:5n) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6n-3) zu biosynthetisieren, ohne dass eine künstliche EPA/DHA Anreicherung erforderlich ist (Kjørsvik et al., 2009; Wold et al., 2009; Gisbert et al., 2005; Cahu et al., 2003). Zudem haben Copepoden den Vorteil, dass sie den Fischlarven optimale DHA:EPA und EPA:Arachidonsäure (ARA) Verhältnisse bereitstellen, die für eine erfolgreiche Aufzucht vieler Fischlarven mariner Arten erforderlich sind. Zudem tragen einige Copepodenarten auch zur Deckung anderer essentieller Mikronährstoffe bei wie z.B. Vitamin A, C, E, Taurin und Mineralien. Gegenwärtig besteht jedoch weiterhin die größte Herausforderung darin, die Massenproduktion von Copepodennauplien nicht nur in der für die kommerzielle Nutzung erforderlichen Mengen zu erreichen, sondern diese auch kostengünstig zu gestalten (Dhont et al. 2013; Conceição et al., 2010).

Dies liegt zu einem wesentlichen Teil daran, dass für eine erfolgreiche Zucht von Copepoden Mikroalgen benötigt werden. Diese werden in hoher Anzahl und in hoher Qualität hinsichtlich ihrer Biomassezusammensetzung benötigt. Die Optimierung der Mikroalgenzucht hinsichtlich Futterqualität, Produktionskosten und erreichbare Zelldichte sollte deshalb in einem Projektteil intensiv untersucht werden.

Um auf Copepodenseite mögliche Optimierungen zu erreichen sollte in einem Projektteil der zyklopoide Copepode *Apocyclops panamensis* (*A. panamensis*) als eine alternative Copepodenart zu dem normalerweise verwendeten Copepoden *Acartia tonsa* untersucht werden. *A. panamensis* hat eine kurze Generationszeit und schnelle Reproduktionsraten, kann sich von einer Vielzahl von Nahrungsmitteln ernähren und ist ziemlich resistent gegenüber äußeren Bedingungen wie Temperatur und Salzgehalt. Die Nauplien von *Apocyclops* sind sehr klein und erreichen eine Größe von 60 bis 80 µm, was die geeignete Größe für das Anfangsfutter für Fischlarven ist.

Als gemeinsames, übergeordnetes Ziel in diesem Projekt sollte letztendlich eine Verbesserung des Wachstums und vor allem der Überlebensrate von marinen Fischlarven durch eine optimierte Fütterung erzielt werden. Hierzu sollten in den ersten Wochen nach Schlupf die Auswirkungen der Verwendung von verschiedenen Copepodennauplien bezüglich Wachstum, Überlebensrate, Deformationen und Verdauungsenzymkapazität der Fischlarven evaluiert werden. In diesem Zusammenhang wurden drei Versuche zur Optimierung der Ernährung mit Copepoden durchgeführt.

# MATERIAL UND METHODEN

---

## BLUEBIOTECH

---

### UNTERSUCHTE ALGENARTEN

---

Geeignete Futteralgen für die Aufzucht von Zooplankton für eine nachfolgend erfolgreiche Aufzucht von Fischlarven sollten bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Vor allem Zellgröße und Inhaltsstoffe (wie z.B. ein vielseitiger Fettsäuregehalt) sind von großer Bedeutung. In die engere Wahl fielen die Mikroalgen *Rhodomonas salina*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis chuii*, *Phaeodactylum tricornutum* und *Pavlova lutheri*.

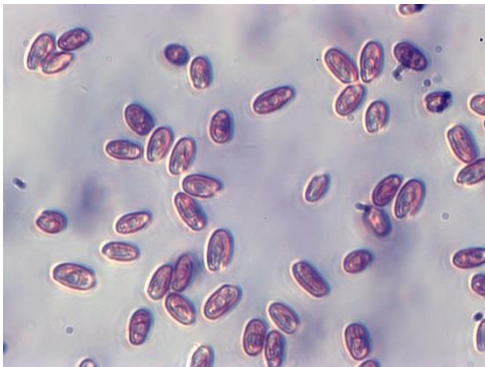


ABB. 1 *RHODOMONAS SALINA*



ABB. 2 *ISOCHRYSIS GALBANA*

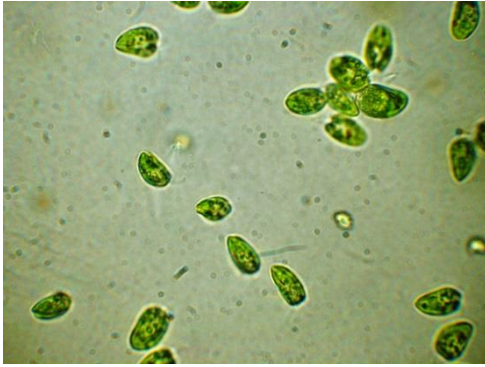


ABB. 3 *TETRASELMIS CHUII*

TAB. 1 ÜBERSICHT ÜBER DIE EINGESTEZTEN ALGENSPEZIES – GRÖSSEN UND FETTSÄUREN

Spezies	Ø Zellgröße [µm]	Wichtige Fettsäuren
<i>Rhodomonas</i>	5 – 13	DHA und EPA
<i>Isochrysis</i>	3 -5	DHA
<i>Tetraselmis</i>	6 - 10	EPA
<i>Phaeodactylum</i>	3-5, 13 -25	EPA
<i>Pavlova</i>	3 - 6	DHA und EPA

---

## KULTIVIERUNG

---

### GLASREAKTOREN

---

Für erste Kultivierungsversuche der ausgewählten Algenspezies wurden 1-Liter-Photobioreaktoren aus Glas genutzt. Diese Bioreaktoren sind vollständig autoklavierbar, was eine Kultivierung unter sterilen Bedingungen ermöglicht. Die Reaktoren werden, nachdem Medium und Algenzellen eingefüllt wurden, über sterile Zu- und Abluftschläuche aus Silikon mit einem Luft-CO<sub>2</sub>-Gemisch begast. Um die sterile Kultivierung zu gewährleisten werden Zu- und Abluft über Sterilfilter (Sartorius, Porengröße 0,2 µm) zu- bzw. abgeführt. Um ein mögliches Absetzen der Algenzellen zu verhindern, können die Bioreaktoren wahlweise auf Magnetrührern betrieben werden.





ABB. 4 GLASREAKTOREN

Nach erfolgreicher Kultivierung der Algen in den 1-Liter-Reaktoren können upscales in Reaktoren derselben Bauart auf ein Volumen von bis zu 5 Litern vorgenommen werden.

### PE-REAKTOREN

In PE-Photobioreaktoren, die nach dem Air-Lift-Prinzip arbeiten, ist es möglich Kulturvolumina von bis 300 Liter anzusetzen. Diese Reaktoren sind nicht mehr als ganzes sterilisierbar, das Plastik ist aber als tendenziell sauber zu beurteilen. Eine sterile Zufuhr des Luft/CO<sub>2</sub>-Gemisches ist auch bei diesem Reaktortyp über Sterilfilter und autoklavierte Zu-/Abluftschläuche gewährleistet.

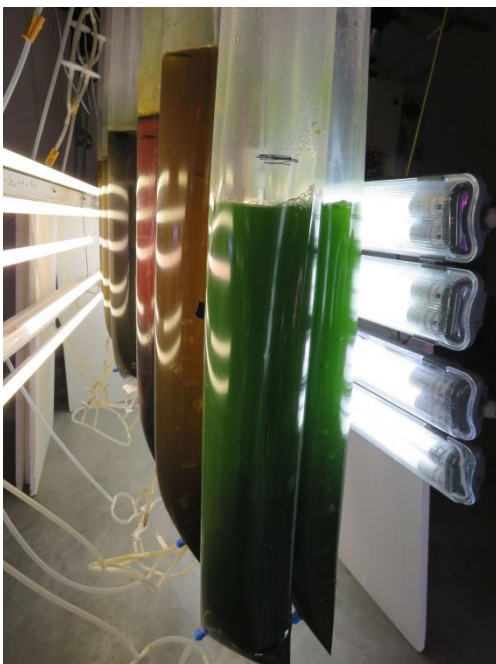


ABB. 5 PE-REAKTOREN 20L

Die Abluft wird bei diesen Reaktortypen über kleine Öffnungen in den Reaktoren oberhalb des Befüllungsrandes ermöglicht; da in den Reaktoren ein Überdruck herrscht, ist das Risiko einer Kontamination über diese Öffnungen als vernachlässigbar einzustufen.

---

## RUNDBECKEN

---

Ein weiterer Reaktortyp, der in diesem Projekt zu Einsatz kam, ist ein offenes Becken mit einem Fassungsvermögen von ca. 250 Litern.

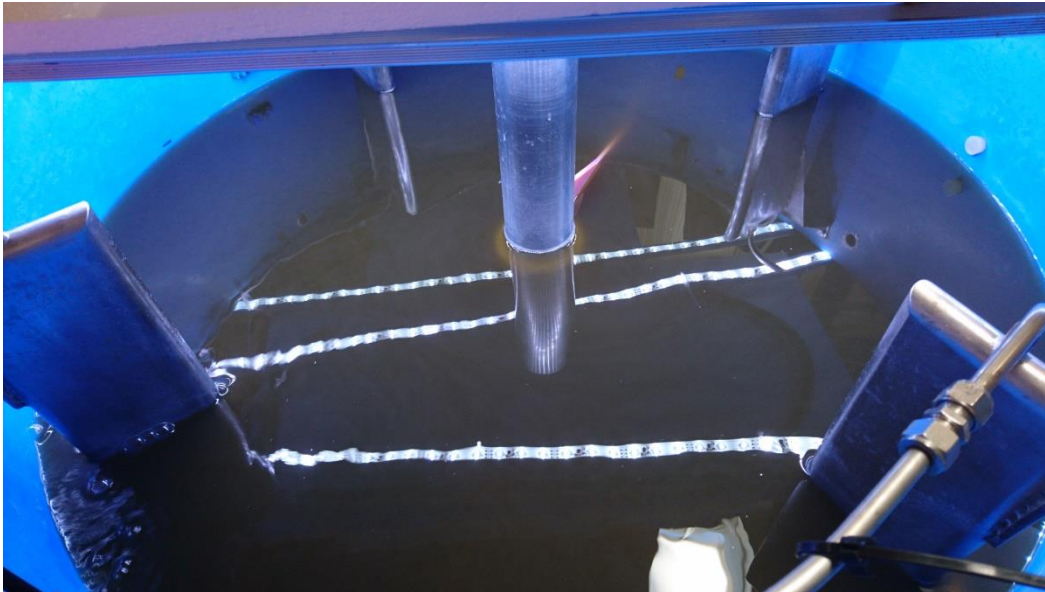


ABB. 6 RUNDBECKEN

Die Beleuchtung wird von oben gegeben, ein Rührarm sorgt für eine gleichmäßige Durchmischung der Kultur. Dieser Reaktortyp lässt keinen sterilen Betrieb zu. Die große Oberfläche erhöht zudem die Gefahr einer Kontamination von außen. Der Vorteil dieses Reaktortyps ist allerdings die verhältnismäßig einfache Inbetriebnahme und Reinigung. Nachteilig sind aber – wie bereits beschrieben – die Anfälligkeit für Kontaminationen und die gegenüber den PE-Reaktoren geringere zu erzielende Dichte an Algenzellen.

---

## LICHT-,TEMPERATUR- UND PH-REGIME

---

Im Allgemeinen ließen sich alle ausgewählten Arten unter denselben Bedingungen (Licht, Temperatur, pH-Wert und Medienkomponenten ) zufriedenstellend kultivieren. Um bessere Wachstumsraten für einzelne Algenspezies zu erzielen wurden im Laufe des Projektes dahingehende Änderungen an den Kultivierungsbedingungen untersucht/durchgeführt.

Als Lichtquelle wurden i.A. weiße LED-Röhren eingesetzt, die in der Grundeinstellung in einem 12:12 Hell-Dunkel-Rhythmus geschaltet waren.

Eine Temperatur von 20°C (+/- 2°C) wurde von allen untersuchten Algenarten gut toleriert.

Der pH-Wert wurde auf einen Wert von 8,3 eingestellt und durch Zugabe von CO<sub>2</sub> geregelt.

Alle Spezies wurden standardmäßig in Anlehnung an das f/2 Medium nach GUILLARD, R.R.L., 1975 – hergestellt in künstlichem Seewasser (AQUAMEDIC) - kultiviert.

TAB. 2 NÄHRSTOFFE FÜR KULTURMEDIUM

<b>Nährstoff</b>	<b>Einwaage für 1 L f/2 [mg]</b>
NaHCO <sub>3</sub>	150,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5
NaNO <sub>3</sub>	75,0
Vitamin B <sub>12</sub>	0,0001
Vitamin B <sub>7</sub>	0,0001
Vitamin B <sub>1</sub>	0,2
ZnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0,015
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,01
CoSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,012
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0,2
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,5
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	5,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,0065

---

## MESSTECHNIKEN

---

Zur Überwachung und Dokumentation der Vitalität und des Wachstums der Algen wurden regelmäßig verschiedene Parameter der Algenkulturen bestimmt.

### PAM

---

Ein schnell zu bestimmender Parameter ist der sogenannte Yield einer Algenkultur. Mit einem Puls-Amplituden-Modulations (PAM)-Gerät (Waltz, Germany) wird dabei die photosynthetische Aktivität der Algenzellen anhand von Fluoreszenzsignalen gemessen. Bei allen Experimente wurde der photophysiologische Zustand der Algen regelmäßig mit der Puls Amplituden Modulations Technik (PAM) überwacht. Änderungen in den PAM Werten deuten auf physiologische Mangelzustände bzw. Ungleichgewichte hin und die Kultivierungsparameter müssen entsprechend angepasst werden. Dies ist vor allem beim

upscaling der Kulturen entscheidend um vitale, lagerfähige Zellen mit hoher Futterqualität zu erhalten. Hat die Zellkultur dabei einen Yield von  $>0,6$ , kann davon ausgegangen werden, dass die Kultivierungsbedingungen für diese Alge im Optimum sind. Ein Yield  $< 0,5$  deutet auf eine Mangelsituation oder bereits auf das Absterben der Kultur hin. Zu beachten ist dabei, dass die jeweiligen Algenspezies z.T. unterschiedliche Yield-Werte im Optimum aufweisen (z.B. bei *Rhodomonas* bei 0,8, bei *Pavlova* bei 0,6) was auf die spezifische Pigmentausstattung der Algen zurückzuführen ist.

---

#### OD

Ein weiterer, schnell zu bestimmender Parameter während der Kultivierung von Algenkulturen ist die Optische Dichte. Dazu werden drei Milliliter der zu untersuchenden Algenkultur in eine Küvette gegeben und die Extinktion (gegen dest. H<sub>2</sub>O) bei 750nm photometrisch bestimmt. Ein Wachstum der Kultur geht mit einer Zunahme der OD einher. Werden zusätzlich Zellzahlen bestimmt, kann später auf die zeitintensive Zellzählung verzichtet werden, wenn man Eichkurven angelegt.

---

#### BTM

Zur Bestimmung der **Biologischen Trockenmasse** wird ein bestimmtes Volumen der zu untersuchenden Algenkultur über einen eingewogenen Filter (GFC Whatman) filtriert (Vakuumpumpe). Anschließend wird der Filter bei 104°C für 24 Stunden getrocknet. Aus der Differenz der Filtergewichte vor und nach der Trocknung, sowie dem filtrierten Volumen lässt sich errechnen, welche BTM (angegeben in g/L) die Algenkultur hat.

---

#### ZMT

Das Ziel war die Isolierung und molekulare und funktionelle Charakterisierung von Genen, Fettsäure-Desaturasen und Elongasen, die die LC-PUFA-Biosynthese in *Apocyclops panamensis* bestimmen.

Wir haben 4 Desaturasen, darunter 2 Methyl-End- ( $\omega$ x) und 2 Front-End-Desaturasen, sowie 6 Gene für Fettsäure-Elongasen identifiziert und funktionell charakterisiert. Dabei handelt es sich um ratenbegrenzende Enzyme, die für die De-novo-Biosynthese von LC-PUFA erforderlich sind.

Die De-novo-Biosynthese von PUFA erfordert das Vorhandensein von  $\omega$ x-Desaturasen, Enzymen, die eine neue Doppelbindung zwischen einer bereits bestehenden und dem Methyl-Ende der Kohlenstoffkette einfügen. Sie sind für die de novo-Biosynthese der C 18-

PUFAs Linolsäure (LA, 18:2n-6) und  $\alpha$ -Linolensäure (ALA, 18:3n-3) aus Ölsäure erforderlich. Die Konversion von LA und ALA in ARA bzw. EPA erfolgt durch die sequentielle Reaktion von Front-End-Desaturasen und Elongasen. Front-End-Desaturasen führen eine Doppelbindung zwischen der bereits bestehenden und dem vorderen Ende der Kohlenstoffkette ein. Elongasen sind katalysierende Enzyme im Verlängerungsprozess (Bell & Tocher, 2009). Es sind zwei mögliche Wege bekannt, die die Biosynthese von ARA und EPA ermöglichen, nämlich der sogenannte " $\Delta$ 6-Weg" ( $\Delta$ 6-Desaturierung - Elongation -  $\Delta$ 5-Desaturierung) und der " $\Delta$ 8-Weg" (Elongation -  $\Delta$ 8-Desaturierung -  $\Delta$ 5-Desaturierung) (Abb. 7). Ebenso kann die Herstellung von DHA aus EPA über zwei Wege erfolgen, den "Sprecher-Weg" (Abb. 7), der zwei aufeinanderfolgende Elongationen und eine  $\Delta$ 6-Desaturierung zu 24:6n-3, gefolgt von einer  $\beta$ -Oxidation zu DHA, umfasst, und den " $\Delta$ 4-Weg", der nur eine Elongation aus EPA und eine  $\Delta$ 4-Desaturierung umfasst (Boyen et al. 2022).

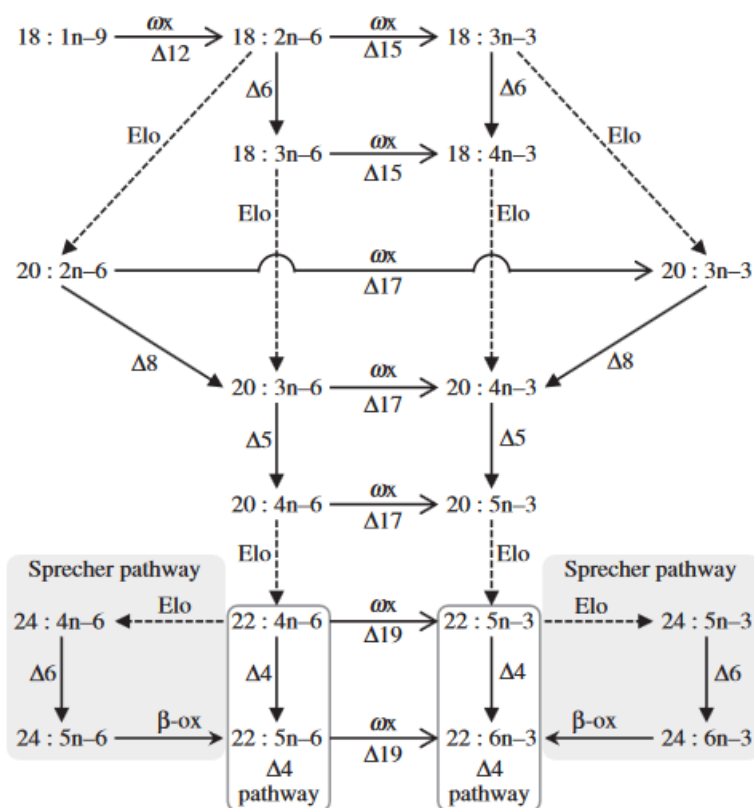


ABB. 7 BIOSYNTHESEWEG VON PUFA (KABEYA ET AL. 2021).

Vor kurzem wurden die Gene, die für  $\omega$ x-Desaturasen kodieren, bei mehreren Arten von Cyclopiden und Harpacticoiden gefunden. Die Funktionalität der Gene wurde jedoch nur bei zwei harpacticoiden Copepoden *Tigriopus californicus* und *Platychelipus littoralis*

nachgewiesen (Kabeya et al., Boyen et al.). Es gab auch indirekte Hinweise darauf, dass ein anderer zyklpoider Copepode, *Apocyclops royi*, die Fähigkeit zur PUFA-Biosynthese besitzt (Nielsen et al. 2019). Diese Befunde lassen vermuten, dass *A. panamensis* ebenfalls die Kapazität besitzt, LC-PUFA, einschließlich  $\omega$ -3 LC-PUFA, zu biosynthetisieren, was ein wertvolles Merkmal als Aquakulturfutter oder als Zusatz zum Futter für Fischlarven in den frühen Wachstumsstadien sein wird.

---

### ISOLIERUNG VON VERMUTETEN DESATURASE- UND ELONGASE-GENEN AUS *A. PANAMENSIS*

---

Um die Kapazität von *A. panamensis* zur PUFA-Biosynthese zu untersuchen, wurde der Ausgangsstock von *A. panamensis* von der Aquacopa GmbH erworben. Die Gesamt-RNA wurde aus ganzen Individuen von *A. panamensis* mit TRI-Reagenz (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) gemäß den Empfehlungen des Herstellers extrahiert. Die extrahierte RNA wurde mit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, USA) behandelt, um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA zu entfernen. Anschließend wurde die komplementäre DNA (cDNA) aus 2  $\mu$ g Gesamt-RNA mit dem Super-Script III First-Strand Synthesis System für RT-PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) synthetisiert. Qualität und Quantität der RNA und DNA wurden mit dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Sequenzen der vermuteten Desaturasen und Elongasen von *A. royi* (Nielsen et al., 2019) wurden als Abfragen verwendet, um durch Blast die Sequenzen dieser Gene aus dem Genom von *A. panamensis* aus der privaten Datenbank zu finden. Die Sequenzen wurden ausgewählt, wenn sie den offenen Leserahmen (ORF) in voller Länge enthielten und ihre vorhergesagten Proteinsequenzen bestimmte Merkmale gemäß Hashimoto et al. (2008) aufwiesen. So enthalten Front-End-Desaturasen drei diagnostische Histidin-Boxen (H-Box) "HXXXH", "HXXXHH" und "QXXHH" sowie ein Häm-Bindungsmotiv (HPGG) in der Cytochrom b5-Domäne. Methyl-End-Desaturasen enthalten die drei H-Boxen "HXXXH", "HXXHH" und "HXXHH" und haben keine Cytochrom-b5-Domäne. Fettsäureelongasen enthalten die H-Box "HXXHH" oder "QXXHH" (Boyen et al., 2020; Hashimoto et al., 2008; Kabeya et al., 2021). Infolgedessen wurden ORFs von 2 Methyl-End- ( $\omega$ x), 2 Front-End-Desaturasen und 6 Fettacyl-Elongasen gefunden und als  $\omega$ x-1,  $\omega$ x-2, Fed1, Fed2 bzw. Elo1 bis Elo6 bezeichnet.

Die ORF-Sequenzen der Desaturasen und Elongasen wurden mittels PCR aus der cDNA von *A. panamensis* unter Verwendung einer High-Fidelity-DNA-Polymerase und Primern mit Restriktionsenzymstellen amplifiziert. Die restriktiven ORF-Fragmente wurden mit T4-DNA-

Ligase (Promega) in einen ebenfalls restriktiven pYES2-Hefeexpressionsvektor (Thermo Fisher Scientific) ligiert und in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Positiv transformierte Kolonien wurden über Nacht in LB-Bouillon gezüchtet, und Plasmidpräparate (GenElute Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich Japan K.K.) wurden zur Bestätigung ihrer Sequenzen an den DNA-Sequenzierungsdienst geschickt.

Die Plasmid-Konstrukte, die die ORF-Sequenzen der Desaturasen und Elongasen von *A. panamensis* enthielten, wurden unabhängig voneinander mit Hilfe des *S. cerevisiae* EasyComp Hefe-Transformationskits (Invitrogen) in kompetente *S. cerevisiae*-Zellen (Stamm INVSc1) transformiert. Die rekombinanten Hefezellen wurden auf *S. cerevisiae* Minimalmedium minus Uracil (SCMM-ura) Agarplatten für 3 Tage bei 30 °C gezüchtet.

---

### FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER DESATURASEN UND ELONGASEN VON *A. PANAMENSIS*

---

Von jedem Gen wurde eine der erfolgreich transformierten Kolonien ausgewählt und für den Test zur funktionellen Charakterisierung verwendet. Eine einzelne Kolonie pro Gen wurde 48 Stunden lang bei 30 °C in SCMM-ura-Bouillon gezüchtet, um eine Massenkultur mit einer OD600 von 8-10 herzustellen. Anschließend wurde ein entsprechendes Volumen der Hefesubstanzkulturen in einem 250-ml-Erlenmeyerkolben mit 5 ml SCMM-ura-Bouillon auf eine OD600 von 0,4 verdünnt. Den Kolben wurden je nach Gen verschiedene mutmaßliche PUFA-Substrate zugewiesen. Die Erlenmeyerkolben wurden 4 Stunden lang bei 30 °C unter ständigem Schütteln (250 U/min) inkubiert, bis sie eine OD600 von ca. 0,6-1,0 erreichten. Anschließend wurden die Kulturen mit 25 % Galaktose ergänzt, um die Transgenexpression zu induzieren, und es wurden entsprechend dem Gen putative PUFA-Substrate in die Kolben gegeben. Für die Methyl-End-Desaturasen waren die exogen zugeführten PUFA-Substrate 18:2n-6, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6, 22:4n-6 und 22:5n-6. Für die Front-End-Desaturasen waren die PUFA-Substrate 18:3n-3, 18:2n-6, 20:3n-3, 20:2n-6, 20:4n-3, 20:3n-6, 22:5n-3 und 22:4n-6. Für die Elongasen waren die PUFA-Substrate 18:3n-3, 18:2n-6, 18:4n-3, 18:3n-6, 20:5n-3, 20:4n-6, 22:5n-3 und 22:4n-6. Jedes PUFA-Substrat wurde in Form von Natriumsalzen in Konzentrationen von 0,5 mM (für C 18), 0,75 mM (für C 20) und 1,0 mM (für C 22) zugesetzt, da die Aufnahmeeffizienz mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge abnimmt (Zheng et al., 2009).

Nach 48 Stunden Inkubation bei 30 °C und kräftigem Schütteln wurden die Hefezellen durch Zentrifugation (2 Minuten, 2000 U/min) geerntet und zweimal in bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Hefepellets wurden anschließend in 8:4:3 (v/v/v) Chloroform:Methanol:Kochsalzlösung (0,88 % KCl) homogenisiert, die 0,01 % (w/v)

butyliertes Hydroxytoluol (BHT, Sigma-Aldrich) als Antioxidans enthält, und vor der FA-Analyse bei -20 °C unter anaeroben Bedingungen für mindestens 24 Stunden gelagert.

---

## FETTSÄURE-ANALYSE

---

Fettsäuremethylester (FAMES) wurden durch säurekatalysierte Umesterung hergestellt und anschließend durch Dünnschichtchromatographie gereinigt. Die FAMES aus den funktionellen Desaturase-Assays wurden mit einem Thermo Trace GC Ultra (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) analysiert, der mit einer offenen Röhrensäule aus Quarzglas 30 m × 0,25 mm (Tracer, TR-WAX (Filmdicke 0,25 µm); Teknokroma, Spanien) ausgestattet und mit einem Flammenionisationsdetektor gekoppelt war. Die Identifizierung erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten der Proben mit kommerziellen FAME-StandardS. Die weitere Bestätigung der Peaks und die Analyse der FAMES einiger Tests erfolgte mit einem Agilent 6850 GC, der mit einem Massenspektrometrie-Detektor (Serie 5975) und einer offenen Röhrensäule von 30 m × 0,25 mm (Tracer, DB5-MS (Filmdicke 0,25 µm); Teknokroma, Spanien) ausgestattet war, wobei die Spektren mit denen der NIST-Bibliothek verglichen wurden. Die Umwandlungseffizienz aller untersuchten Enzyme von *A. panamensis* gegenüber den exogen zugeführten PUFA-Substraten wurde berechnet als:  $(\text{alle Produktflächen}/(\text{alle Produktflächen} + \text{Substratfläche})) \times 100$  (Kabeya et al., 2021).

---

## IMTE

---

---

### GOLDBRASSE (*SPARUS AURATA*) UND ANGEWANDTE FÜTTERUNGSREGIME

---

Fischlarvenaufzuchtversuche wurden mit Goldbrassen (*Sparus aurata*) durchgeführt, die ein großes Potenzial in der kommerziellen Aquakultur besitzen (FEAP, 2021; Georgakopoulou et al., 2010). Goldbrassen gehören neben dem europäischen Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*) zu der am häufigsten gezüchteten Fischart in der EU (FAO, 2020). Die Aufzucht der Larven ist jedoch bis zum Fingerling immer noch mit großen Verlusten verbunden, so dass u. A. die geringe Verfügbarkeit von Setzlingen eine Ertragssteigerung in der Aquakultur derzeit behindert.

Seit 1970 ist die Verwendung von Rotatorien als Erstfütterung immer noch gängige Praxis in der intensiven Aufzucht von Goldbrassen (Dhont et al., 2013), gefolgt von einer langen Artemia-Nauplien/Metanauplien Fütterung (20 dph - 45 dph; siehe Abb. 8). Alternative Fütterungsregime werden in der Industrie aber auch angewandt, wie z.B. das Ersetzen der Rotatorienphase durch eine Copepodenphase oder deren Kombination. Auch ist aus



Kostengründen der Einsatz von kleinen Mengen von Copepoden von Interesse und wird in der Praxis als „Vitamine Pille“ bezeichnet.

Unter Berücksichtigung welche Zusammensetzung dieser Futtermittel die beste ist bezüglich Fischernahrung und -physiologie der Goldbrassen wurden im Rahmen einer Doktorarbeit drei Versuche durchgeführt.

Das erste Experiment diente als Grundlage aller unserer Forschungsarbeiten, bei denen vielfältige Fütterungsregime getestet und verglichen wurden auf Basis der Nährstoffzusammensetzung sowie Fütterungszeit und -häufigkeit während der frühen Larvenstadien. Es sollte festgestellt werden, welches dieser Fütterungsregime zu einer erhöhten Überlebensrate, einem hohen Wachstum und einer verbesserten Qualität der Goldbrassenlarven führt.

Darauf aufbauend wurden im zweiten Versuch die Zeiträume und Mengen der verschiedenen Futtermittel optimiert und der Einfluss einer frühen Umstellung auf Trockenfutter auf die Merkmale untersucht.

Abschließend wurde im dritten Versuch der Effekt einer gleichzeitigen Fütterung einer Copepoden- oder Rotatorien diät mit MD ab Erstfütterung untersucht sowie der Einsatz einer neuen Copepodenart evaluiert. Zudem war Ziel dieses Experiments festzustellen, inwieweit sich eine geringere Menge angereicherter Artemien auf die Entwicklung der Larven auswirkt.

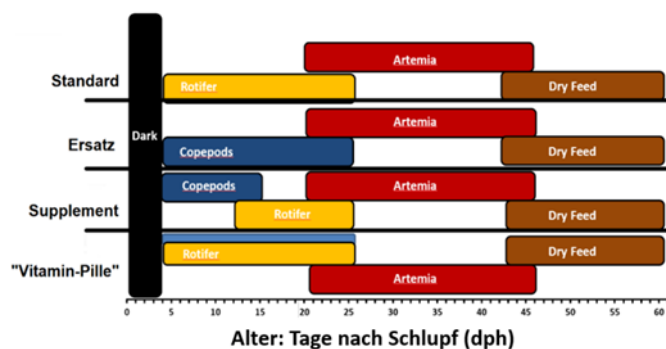


ABB. 8 ÜBERSICHT DER IN DER INDUSTRIE ANGEWANDTEN FÜTTERUNGSREGIME UNTER VERWENDUNG VON COPEPODEN AUF DIE LEISTUNG DER GOLDBRASSE

### VERSUCHSANLAGE UND DURCHFÜHRUNG DER LARVENVERSUCHE

Die Aufzuchtanlage am Fraunhofer-IMTE ist mit 24 konischen Tanks (ca. 60 l Volumen) ausgestattet, die in zwei 6m<sup>3</sup> fassende Auffangtanks eingebettet sind, so dass das Wasser vom Auffangtank durch die Larvenaufzucht tanks zirkuliert (siehe Abb. 9).



ABB. 9 DAS „LARVENMODUL“ AM FRAUNHOFER-IMTE. FOTOKREDIT: BEEKE RÖHE

Die Wasserqualität wurde in den beiden baugleichen Aufzuchtbecken über getrennte Wasseraufbereitungskreisläufe mit UV (Helix Max UV 55W, Aqua Medic), 10-100 µm Filterkartuschen (Polystar-Langzeit-Filterkerze 10, 50 & 100 µm, SPECK Pumpen GmbH), Eiweißabschäumer (EVO 3000, Aqua Medic) und eine Temperaturkontrolle (Titan 6000 Professional (5 kW), Aqua Medic) in optimalen Bereichen gehalten (siehe Abb. 10). Die Wasserparameter wurden täglich gemessen: Sauerstoff  $106 \pm 7,6$  (Handy Polaris, OxyGuard A/S), pH  $8,02 \pm 0,16$  (GMH 3530, Greisinger electronic GmbH); Ammonium (Methode 8155, HACH®) und Stickstoffdioxid: (HC87708, Merck KGaA). Bis zum Ende der Aufzucht wurde ein kontinuierlicher Wasserfluss mit einer anfänglichen Austauschrate von ca. 14 %/h bis zu >100 %/h in jedem Aufzuchtbecken aufrechterhalten. Die Wassertemperatur und der Salzgehalt wurden zunächst auf die von dem Fischbrutbetrieb empfohlenen Werte von 17°C bzw. 34 psu eingestellt.



ABB. 10 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES DER ZWEI EINHEITEN DES LARVENMODULS

Die Temperatur wurde während der Lebendfütterung allmählich auf 20°C erhöht, um die Aufzuchtbedingungen für die heranwachsenden Larven an die natürlichen Lebensbedingungen anzupassen, während der Salzgehalt auf 27 psu sank. Die künstliche Beleuchtungsdauer wurde auf 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit eingestellt, wobei das Licht um 9 Uhr morgens angeschaltet wurde und eine 30-minütige simulierte Morgen- und Abenddämmerungsphase stattfand. Ab 4 dph begann die erste Fütterung mit einer ursprünglich stärkeren Lichtintensität von 600 Lux, die zum Ende der Fütterungsphase bei 20 dph auf 300 Lux geändert wurde. Während dieser Zeit wurde die "Grünwassertechnik" angewandt, d.h. jedes Becken erhielt zweimal täglich um 9 Uhr und 21 Uhr ein mit Meerwasser vorgemischtes Mikroalgenkonzentrat von *Nannochloropsis sp.* (12.000.000.000 Zellen pro ml, BlueBioTech, Deutschland).

---

## LEBENDFUTTERKULTIVIERUNG UND -ZÜCHTUNG WÄHREND DES LARVENVERSUCHS

---

Um die für diese Versuche benötigten Lebendfutterorganismen bereitzustellen, musste ein Lebendfuttermodul betrieben werden. Das Lebendfuttermodul bestand aus mehreren zylindrischen Tanks mit konischem Boden und einem Fassungsvermögen von bis zu 300 Litern. Es wurden Rotatorien aufgezogen und angereichert sowie Copepoden und Artemien-Zysten (Ocean Nutrition) in zwei verschiedenen Größen (AF 430µm, 300.000 NPG zu Beginn des Versuchs; Artemia-Metanauplien 660µm, 250.000 NPG später im Versuch) erbrütet und angereichert.

Eine Rotatorienstarterkultur für eine Produktion in kleinen Mengen, d.h. in 15l Flaschen, wurde sehr früh vor dem geplanten Startdatum der Larvenkultur erworben und deren Einsatz etabliert. Anschließend wurde eine größerskalige Rotatorienkultur aufgebaut, um deren Wachstum, Verhalten, Fortpflanzung usw. für eine zuverlässige und stabile Massenproduktion einschätzen zu können. Diese Rotatorien (*Brachionus ibericus*, L-Typ; Planktovie, Frankreich) wurden in 90-Liter-Behältern aufgezogen und täglich mit 8-15 ml konzentriertem *Nannochloropsis sp.* gefüttert. Sowohl Rotatorien als auch Artemia metanauplii wurden vor jeder täglichen Fütterung angereichert, wobei die Menge der Anreicherung an die geerntete Anzahl pro Million angepasst wurde. Die täglich benötigte Menge wurde morgens geerntet, die Anreicherung dauerte ca. 12 Stunden bei 25°C. Copepoden wurden unmittelbar vor Beginn des Experiments in ausreichender Menge in Zystenform bereitgestellt (*Acartia tonsa*, C-Feed AS, Norwegen). Die notwendige Menge für die tägliche Fütterung zu Beginn des Versuchs wurde jeden Tag erfasst und die zylindrisch-konischen Glasfasertanks mit einem Fassungsvermögen von 300 Litern vorbereitet. Diese Tanks wurden auf 26°C vorgeheizt und die Eier von *Acartia tonsa* wurden gewaschen und bis zum Schlupf über 24 h erbrütet. Die geschlüpften Nauplien wurden dann in den benötigten Mengen an die dafür vorgesehenen Gruppen verfüttert.

---

## BEPROBUNG FÜR DIE ERHEBUNG DER MERKMALE

---

Fünfzehn Larvenproben wurden nach dem Zufallsprinzip aus jedem Becken entnommen, und zwar in kurzen Abständen von drei Tagen zwischen 4 dph und 30 dph, danach wurde alle 5 Tage beprobt. Die erste Probe (Tag 0) wurde vor Beginn des Fütterungsversuchs entnommen. Alle entnommenen Larven wurden auf Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung in Meerwasser bei -80°C gelagert. Das Larvenwachstum wurde durch die Merkmale Standardlänge und Trockengewicht dargestellt, wobei die Gesamtlänge jeder beprobten Larve mit einem Stereomikroskop (M80 Leica) gemessen wurde. Das Gewicht jeder einzelnen Fischprobe wurde in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen ermittelt. Diese Röhrchen wurden gefriergetrocknet (Alpha 1-2 LD plus, Christ) und das Trockengewicht jeder Larve

wurde gemessen (Cubis® Ultramicro Balance MSA, Satorius). Die toten Larven wurden ab 4 dph täglich vom Boden der Aufzuchtbecken aufgesammelt, um die täglichen Verluste für jedes Becken zu erfassen.

# ERGEBNISSE

## BLUEBIOTECH

### WACHSTUM

Wie bereits erwähnt, war es möglich alle ausgewählten Algenarten unter den ursprünglich ausgewählten Bedingungen (Nährstoffe, Licht, Temperatur, pH) zu kultivieren (vgl. Abb. 11, Abb. 12, Abb. 13, Abb. 14 und Abb. 15).

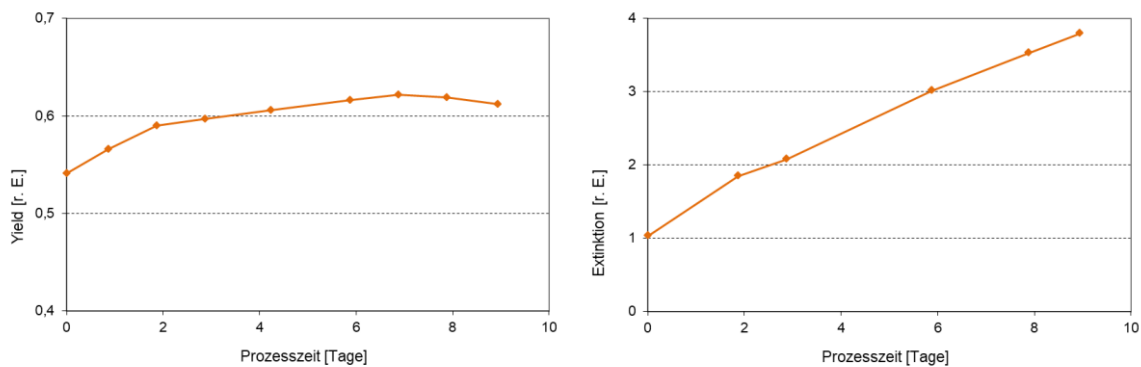


ABB. 11 YIELD UND EXTINKTION VON *P. LUTHERI* BEI 20°C

Abb. 11 zeigt den Yield und die Zunahme der Optischen Dichte von *P. lutheri* über einen Zeitraum von ca. zehn Tagen. In der Darstellung des Yields ist zu erkennen, dass sich der Wert nach einer kurzen lag-Phase von 0,55 auf ca. 0,62 steigert und dort über den Rest der Zeit verbleibt. Ein Yield von über 0,6 zeigt (nach bisherigen Erkenntnissen) auf optimale Wachstumsbedingungen hin. Die OD nimmt in dieser Kultivierung konstant über den gesamten Zeitraum zu (von 1,0 bis auf 3,8 am neunten Tag).

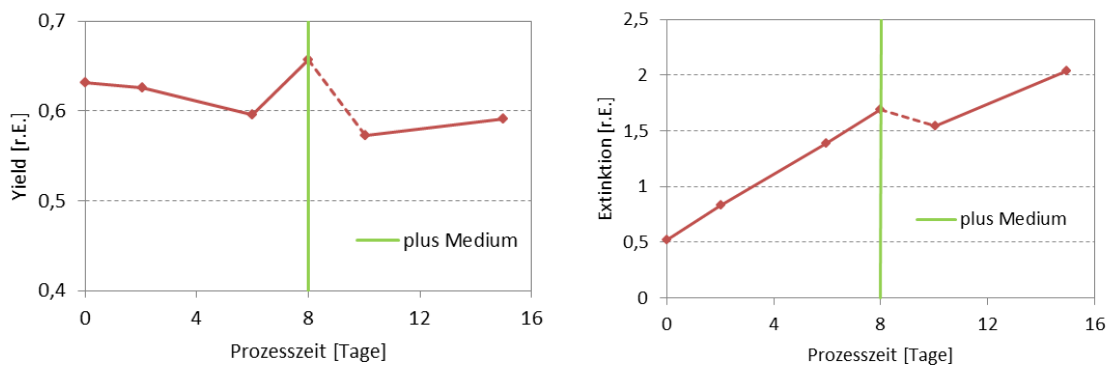


ABB. 12 YIELD UND EXTINKTION VON *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

In Abb. 12 ist der Yield und die Zunahme der OD von *P. tricornutum* über einen Zeitraum von 18 Tagen dargestellt. Am 13. Tag der Kultivierung wurde eine Verdünnung vorgenommen, was vor allem durch die Abnahme in der OD deutlich wird.

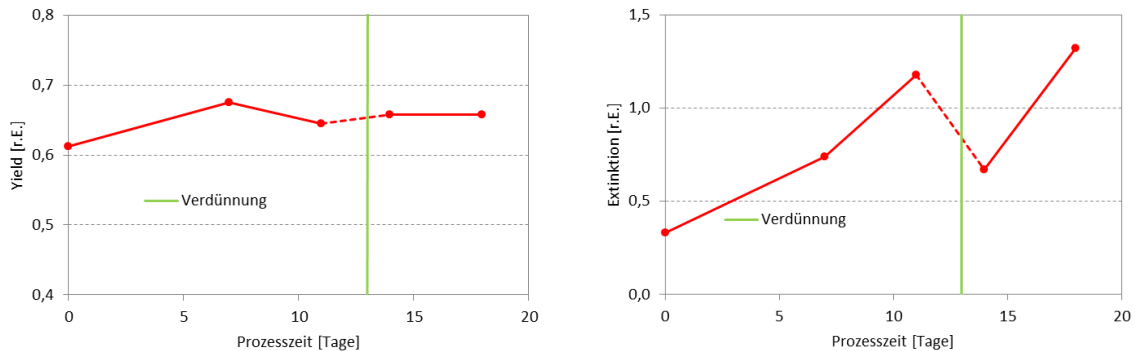


ABB. 13 YIELD UND EXTINTION VON *RHODOMONAS* SP.

*Rhodomonas* (vgl. Abb. 13) erzielte in dieser Kultivierung einen Yield zwischen 0,6 und 0,7, was für sehr gute Wachstumsbedingungen spricht. Diese Alge zeigte unter den gegebenen Bedingungen eine gute Zunahme der OD – innerhalb von sieben Tagen wurde eine Zunahme von 0,8 OD-Einheiten verzeichnet.

*I. galbana* (Abb. 14) wurde unter den anfänglich gewählten Bedingungen für 24 Tage kultiviert, am 15. Tag wurde auch bei diesem Ansatz eine Verdünnung mit frischem Medium durchgeführt.

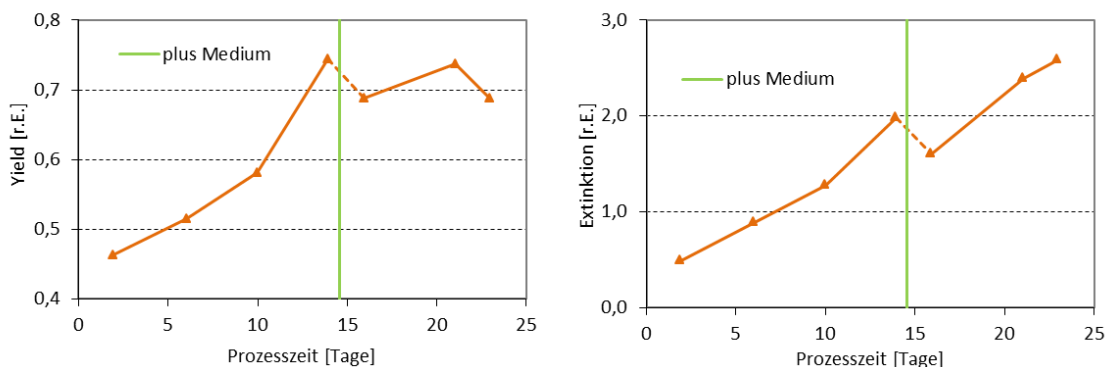


ABB. 14 YIELD UND EXTINTION VON *ISOCHRYISIS GALBANA*

Der Yield dieser Alge zeigt in diesem Ansatz eine längere lag-Phase auf. Zu Beginn der Kultivierung hatte die Kultur einen Yield von 0,45. Der Wert steigerte sich über ca. 14 Tage auf einen Wert von 0,75. Ein Wert von über 0,7 zeigt i.A. eine gute photosynthetische Aktivität für *Isochrysis*. Die OD nahm schon bei suboptimalem Yield stetig über die Prozesszeit zu (von 0,5 bis auf 2,0). Die Verdünnung verursachte technisch bedingt eine Abnahme in diesem Parameter, um dann mit gleicher Steigung weiter zuzunehmen.

*T. chuii* (Abb. 15) wurde ebenfalls für 24 Tage unter den Standardbedingungen kultiviert. Am fünften und am 19. Tag wurde diese Kultur jeweils mit frischem Medium verdünnt.

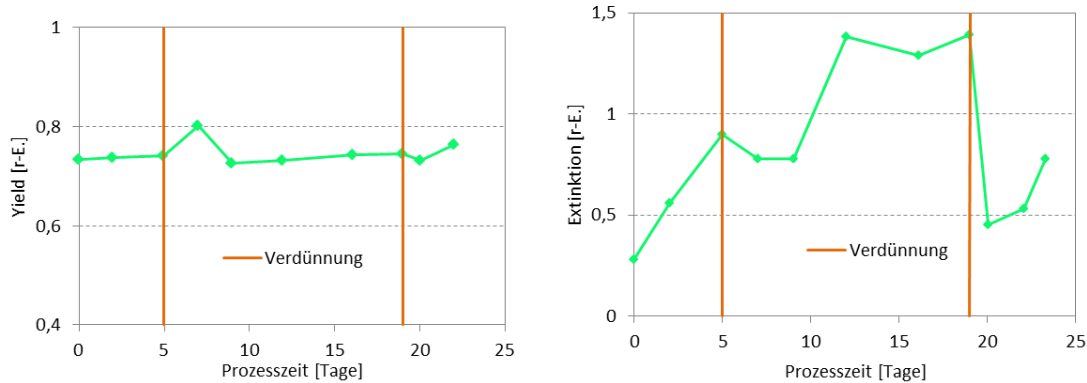


ABB. 15 YIELD UND EXTINTION VON *TETRASELMIS CHUII*

*T. chuii* zeigt über die gesamte Kultivierungszeit einen Yield von über 0,7, was auf eine sehr gute photosynthetische Aktivität hinweist. Eine lag-Phase zu Beginn der Kultivierung oder auch nach den teilweise starken Verdünnungen konnte nicht festgestellt werden. In der OD ist eine Zunahme von ca. 0,5 Einheiten innerhalb von fünf Tagen möglich. Diese Alge neigt zu Wandbewuchs in den Reaktoren, welcher zu Lichtlimitierungen führen kann.

*Pavlova lutheri* und *Phaeodactylum tricornutum* zeigten im weiteren Verlauf eine geringe Temperaturtoleranz, daher wurden diese Alge im Projekt nicht weiter verfolgt.

---

## OPTIMIERUNG DES MEDIUMS

---

Für die drei ausgewählten Algenarten wurde im weiteren Verlauf des Projektes untersucht, ob mittels Veränderungen im Medium das Wachstum verstärkt werden konnte.

Im Standardmedium f/2 für die Algenkultivierung sind Vitamine enthalten. Da Vitamine im Medium einerseits zu einem verstärkten Wachstum der Algen führen können, andererseits aber auch das Wachstum unerwünschter Bakterien unterstützen wurde die Dosierung der Vitamine optimiert. Da die Vitamine gegenüber den sonstigen Mediumkomponenten relativ teuer sind, wird - wenn möglich - auf diese Medienkomponente verzichtet. Daher sollte untersucht werden, ob die ausgewählten Algenarten ohne Vitamine kultivierbar ist.

---

## RHODOMMONAS - VITAMINBEDARF

---

Um herauszufinden, ob *Rhodomonas* Vitamine im Medium benötigt, wurden zwei Kulturen angesetzt: die eine mit Medium, welches Vitamine enthält, die andere mit Medium ohne Vitamine. Da die Zellen des Inokulums aus Medium mit Vitaminen stammten und daher



Vitamine mit in den Versuchsaufbau einbrachten, wurden die Kulturansätze regelmäßig mit dem jeweiligen Medium verdünnt. Zudem zeigen sich bestimmte Nährstoff-Limitierungen erst nach einer längeren Kultivierung.

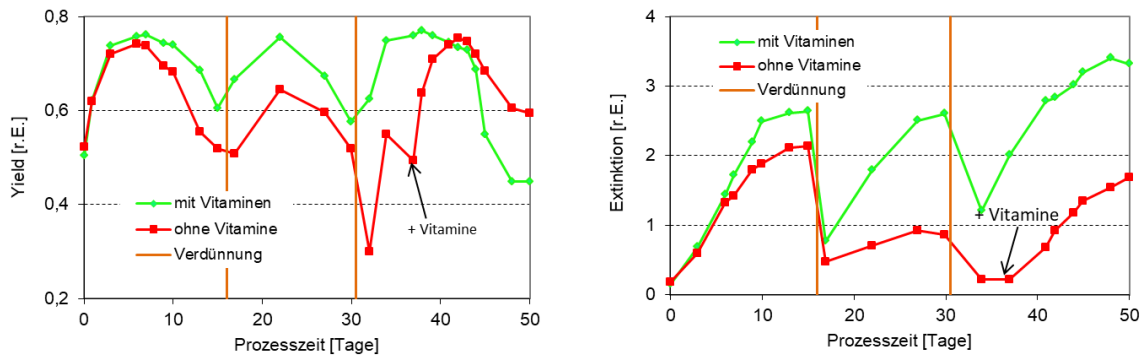


ABB. 16 YIELD UND EXTINKTION VON *RHODOMONAS* SP. UNTER NORMALEM MEDIUM UND VITAMINLIMITATION

Abb. 16 zeigt den Yield und OD von *Rhodomonas* während der Kultivierung in Medium mit und ohne Vitamine. Schon vor der ersten Verdünnung mit dem jeweiligen Medium sinkt der Yield in beiden Versuchsansätzen ab, was auf eine Nährstoff- bzw. Lichtlimitation zurückzuführen ist (da zu diesem Zeitpunkt bereits eine OD von 2 bzw. 2,8 erreicht worden war). Auffällig ist, dass der Yield in dem Ansatz ohne Vitamine stärker abfällt und auch die OD hinter der des Ansatzes mit Vitaminen zurückbleibt. Nach der ersten Verdünnung steigt der Yield im Ansatz mit Vitaminen auf 0,75 wieder an, während im Ansatz ohne Vitamine der Yield zwar auch wieder deutlich ansteigt, aber weiterhin unter dem des Ansatzes mit Vitaminen bleibt. Besonders deutlich wird der Unterschied in der Darstellung der OD: nach der ersten Verdünnung steigt diese im Ansatz mit Vitamine auf erneut 2,8 an, während im Ansatz ohne Vitamine nur noch eine geringe Zunahme (von 0,5 bis ca. 1,0) zu verzeichnen ist. Nach der zweiten Verdünnung ist fast keine Zunahme in der OD dieses Ansatzes zu erkennen, erst nach einer gezielten Zugabe von Vitaminen ist wieder eine deutliche Zunahme in der OD – und vor allem im Yield – zu verzeichnen. Damit kann davon ausgegangen werden, dass *Rhodomonas* auf Vitamine im Medium angewiesen sind.

### ISOCHRYSIS – VITAMINBEDARF

Zur Überprüfung des Vitaminbedarfes von *I. galbana* wurde diese Alge in einem 0,5 Liter-Photobioreaktor mit vitaminfreiem Medium kultiviert. Diese Kultur wurde regelmäßig mit diesem Medium verdünnt. Die Vitalität der Kultur wurde mittels PAM bestimmt. Bei einem sehr niedrigen Yield wurden gezielt Vitamine zugegeben.

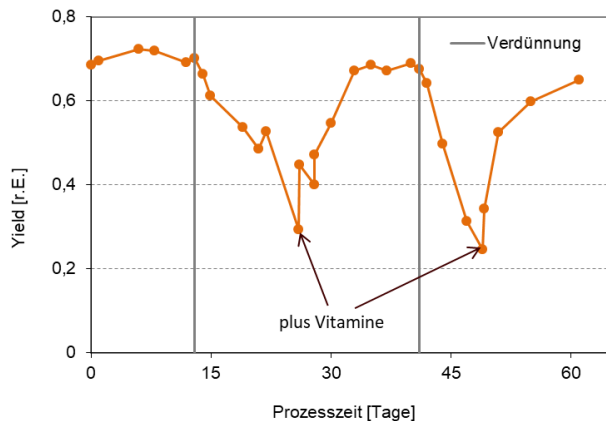


ABB. 17 YIELD VON *I. GALBANA* IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VERFÜGBARKEIT VON VITAMINEN IM MEDIUM

In Abb. 17 sind die Messungen des Yields von *I. galbana* unter Vitamin-Limitierung über die Versuchslaufzeit abgebildet. Bis zur ersten Verdünnung wies die Kultur einen guten Yield von ca. 0,7 auf. Die Zellen des Inokulums waren damit noch nicht vitamin-limitiert und vermutlich wurde mit dem eingesetzten Kulturvolumen genügend Vitamine für ein Wachstum der Kultur eingebracht.

Nach der ersten Verdünnung sank der Yield der Kultur stetig ab, bei einem Yield von 0,3 (der schon als kritisch für das Überleben einer *Isochrysis* –Kultur angesehen werden kann) wurde die dem Gesamtvolumen entsprechende Menge Vitaminmix zugeführt. Bereits nach zwei Stunden war ein Anstieg des Yields zu messen. Nach weiteren fünf Tagen hatte sich der Yield der Kultur vollständig erholt (auf ca. 0,7). Eine erneute Verdünnung mit vitaminfreiem Medium führte auch zu einem erneuten schnellen Absinken des Yields. Eine Zugabe von Vitaminen zog wieder einen schnellen Anstieg des Yields nach sich. Damit sind für *Isochrysis* Vitamine im Medium essentiell.

#### *TETRASELMIS* – VITAMINBEDARF

Auch *Tetraselmis* wurde einmal mit und einmal ohne Vitamine im Medium kultiviert um den Vitaminbedarf dieser Alge zu ermitteln. Wie auch bei *Isochrysis* wurden die Kulturen mit dem jeweiligen Medium verdünnt.

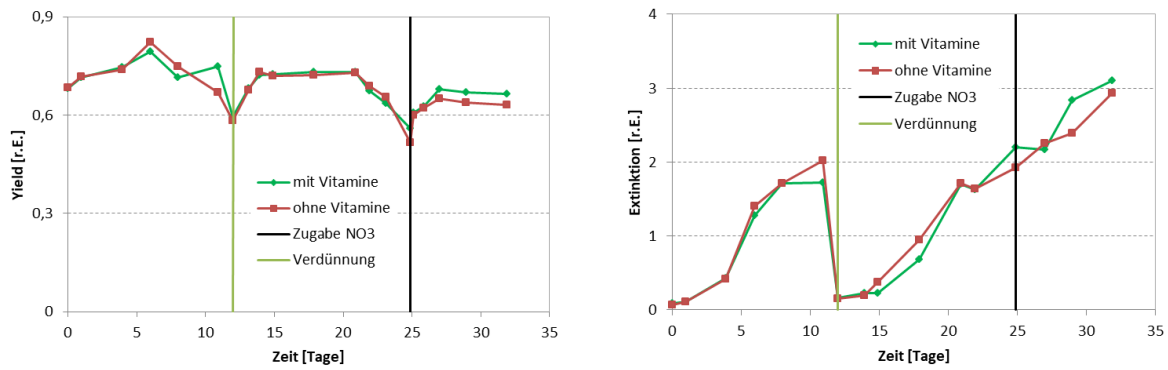


ABB. 18 YIELD UND OD VON *T. CHUII* IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VERFÜGBARKEIT VON VITAMINEN IM MEDIUM

Aus Abb. 18 wird er sichtlich, dass *Tetraselmis* keine Vitamine im Medium benötigt und dass ein Vorhandensein von Vitaminen im Medium keinerlei positiven Effekte auf *Tetraselmis* hat. Die Kurven des Yields und der OD verlaufen in beiden Versuchsansätzen beinahe identisch. Die Kulturen hatten zu Beginn des Versuches einen Yield nahe 0,75. Dieser Wert begann bei beiden Ansätzen zu sinken, eine Verdünnung der Kulturen mit dem jeweiligen Medium führte zu einem raschen Anstieg dieses Parameters, so dass vermutlich ein anderer Nährstoff limitierend war.

Als der Yield nach ca. 20 Tagen erneut in beiden Ansätzen zu sinken begann wurde den Kulturen Stickstoff in der dem Medium und Volumen entsprechenden Menge zu gefügt. In beiden Ansätzen konnte daraufhin ein erneuter Anstieg des Yields festgestellt werden und darüber hinaus ein weiterer Anstieg der OD.

Damit benötigt *Tetraselmis* nachweislich keine Vitamine im Medium und wurde im weiteren Projektverlauf ohne Vitamine kultiviert.

### *RHODOMONAS* - STICKSTOFFBEDARF

Für *Rhodomonas* sollte herausgefunden werden, ob eine erhöhte Stickstoffkonzentration im Medium zu verbessertem Wachstum dieser Alge führt. Dazu wurden vier Bioreaktoren mit Medium befüllt, wobei diese sich in der Stickstoffkonzentration unterschieden (einfach, doppelt, dreifach und vierfach). Die Ansätze wurden während der gesamten Versuchslaufzeit zweimal mit dem jeweiligen Medium verdünnt.

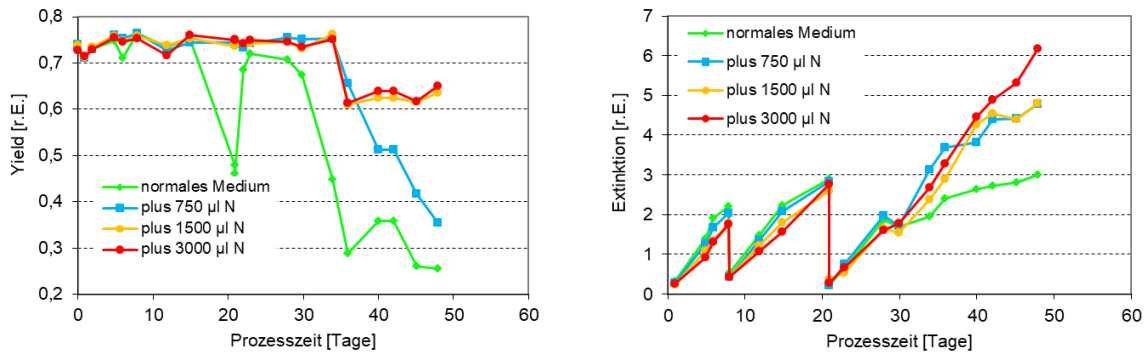


ABB. 19 WACHSTUM VON *RHODOMONAS* BEI UNTERSCHIEDLICHEN STICKSTOFF-KONZENTRATIONEN

Bei der Betrachtung der Darstellung der Optischen Dichte von *Rhodomonas* über die Versuchslaufzeit ist zunächst nur ein geringer Unterschied zwischen den Ansätzen erkennbar; der Ansatz mit der höchsten Stickstoffkonzentration bleibt immer etwas hinter den anderen zurück. Nach der letzten Verdünnung zeigt sich aber, dass der Ansatz mit der geringsten Stickstoffkonzentration lediglich eine OD von 3 erreicht, während die Ansätze mit doppelt und dreifacher Konzentration beide annähernd eine OD von 5 erreichen. Der Ansatz mit der höchsten Stickstoffkonzentration hatte am Versuchsende eine OD von über 6.

In der Betrachtung des Yields sind die Unterschiede zwischen den vier Ansätzen deutlicher. Im Ansatz mit einfacher Stickstoffkonzentration beginnt der Yield nach wenigen Tagen bereits an zu sinken, eine Verdünnung mit frischem Medium führt zu einer schnellen Erholung der photosynthetischen Aktivität der Kultur. Nach der letzten Verdünnung und dem damit verbundenen erhaltenen Yield, sinkt dieser Parameter stetig, so dass diese Kultur am Versuchsende lediglich noch einen Yield von 0,25 hat. Der Yield des Ansatzes mit doppelter Stickstoffkonzentration beginnt erst später zu sinken, hier liegt der Wert am Versuchsende bei 0,35. Auch die anderen beiden Ansätze weisen einen sinkenden Yield auf, welcher aber bis zum Versuchsende auf einem Plateau von ca. 0,6 bleibt.

Es kann somit gefolgert werden, dass sich eine erhöhte Stickstoffkonzentration positiv auf das Wachstum von *Rhodomonas* auswirkt. Auch höhere Biomassen sind möglich, vorausgesetzt der Kultur wird ausreichend Licht gegeben.

### ISOCHRYSIS - STICKSTOFFBEDARF

Um zu überprüfen, wie das Wachstum von *Isochrysis* vom Vorhandensein von Stickstoff beeinflusst wird, werden zwei 0,5 Liter-Bioreaktoren mit *Isochrysis* beschickt. Dabei wird in dem einen Reaktor das übliche Medium verwendet (normal), der andere Ansatz enthält die doppelte Menge an Stickstoff im Medium (plus N).

Abb. 20 zeigt den Yield und die OD der beiden Kulturen über die Versuchslaufzeit.

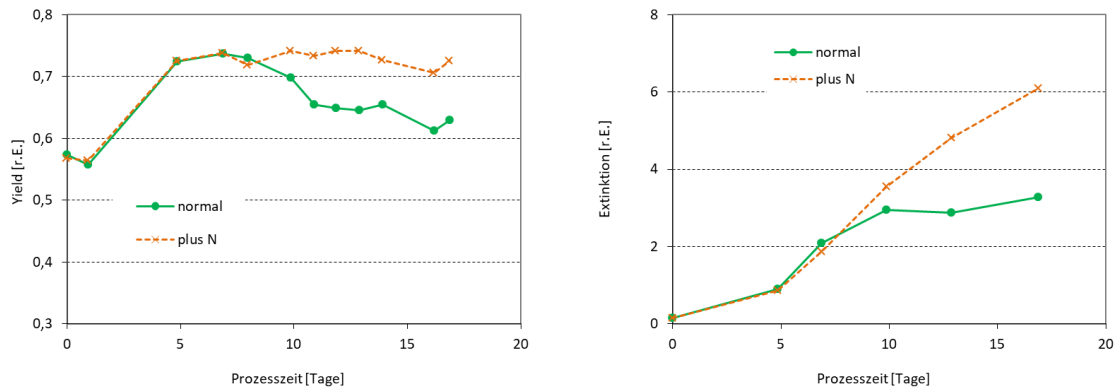


ABB. 20 ISOCHRYSIS – YIELD UND WACHSTUM IN ABHÄNGIGKEIT VON STICKSTOFF

Bis zu einer OD von ca. 3 verläuft das Wachstum in beiden Kulturansätzen annähernd gleich. Beide Kulturen haben einen Yield von über 0,7, die OD nimmt kontinuierlich zu. Ab dem neunten Tag, beginnt der Yield im Ansatz mit normalem Medium an zu sinken, auch die OD steigt nur wenig weiter an. Am 17. Tag hat der Ansatz mit normalem Medium einen Yield nahe 0,6 – der Ansatz mit doppelt Stickstoff im Medium weist einen Yield von 0,7 auf. Die OD im Ansatz mit normalem Medium liegt bei ca. 3,5, während sie im Ansatz mit doppelt Stickstoff auf 6 angestiegen ist. Damit scheint auch für das Wachstum von IsochrYSIS eine erhöhte Stickstoffkonzentration im Medium von Vorteil zu sein.

### TETRASELMIS – NÄHRSTOFFBEDARF

Auch für *Tetraselmis* sollte überprüft werden, welche Nährstoffkonzentrationen für eine möglichst hohe Biomasse verwendet werden sollte. Es wurden vier baugleich Reaktoren eingesetzt, die mit Medium mit unterschiedlichen Nährstoffkonzentrationen befüllt wurden. Als Inoculum wurde allen Ansätzen eine gewisse Menge einer vitalen *Tetraselmis*kultur hinzugefügt (Verhältnis 1:10).

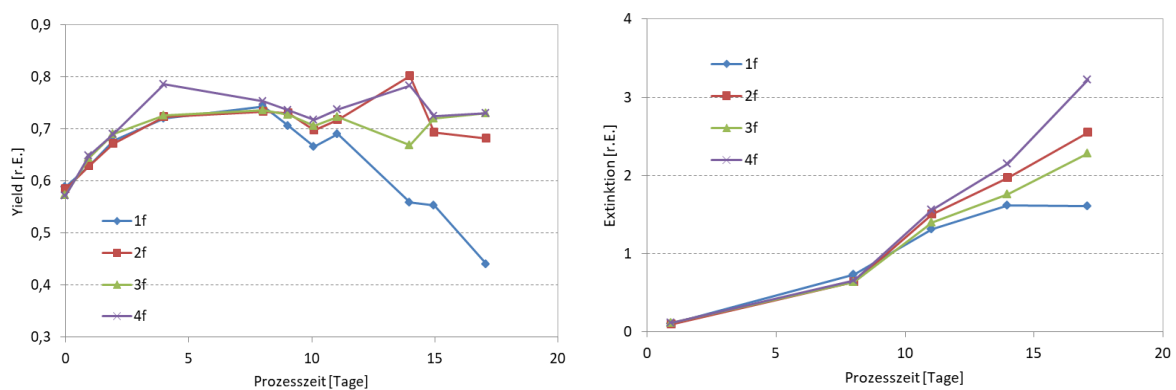


ABB. 21 TETRASELMIS – YIELD UND WACHSTUM IN ABHÄNGIGKEIT DER NÄHRSTOFFKONZENTRATION

Abb. 21 zeigt den Yield und die OD der *Tetraselmis*kulturen unter verschiedenen Nährstoffbedingungen über die Versuchslaufzeit. In den ersten Tagen des Versuches liegen Yield und Extinktion der Kulturen nahe beieinander, so dass zunächst kein Unterschied zu erkennen ist.

Im Yield zeigen sich nach ca. zehn Tagen erste Unterschiede zwischen den Ansätzen: im Ansatz mit 1f beginnt der Yield der Kultur zu sinken. Bis zum Versuchsende ist der Yield dieses Ansatzes auf 0,45 gesunken. Der Yield der anderen Ansätze bleibt (bis auf einige Abweichungen) auf einem hohen Level (0,65 bis 0,75), was auf gute Kultivierungsbedingungen hinweist.

In der Optischen Dichte sind deutliche Unterschiede zwischen den Ansätzen ab dem 14. Versuchstag zu erkennen. Am Versuchsende hat der Ansatz mit 1f die geringste OD erreicht, der Ansatz mit 4 f die höchste. Letzterer hat eine gut doppelte so hohe OD erreicht wie der Ansatz mit 1f.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass für eine hohe Biomasse an *Tetraselmis* das Medium entsprechend angepasst werden muss, wobei natürlich auch das Lichtregime entsprechend gewählt werden muss.

---

## TEMPERATURBEDINGUNGEN

---

Alle Algen haben eine jeweils spezifische Toleranzbreite für Temperatur und unterscheiden sich dabei potentiell durch unterschiedliche Temperaturoptima. Um optimale Produktionsbedingungen für die jeweilige Algenart zu nutzen wurden umfangreiche Versuche zur Ermittlung der algenspezifischen Temperaturoptima bei optimaler Nährstoffversorgung durchgeführt.

---

### *ISOCHRYSIS* TEMPERATUR

---

Um das Temperaturoptimum für *Isochrysis* zu bestimmen, wurden 4 Photobioreaktoren (0,5 Liter) mit einer vitalen *Isochrysis*kultur und Vollmedium beschickt. Die vier Reaktoren wurden mittels Heizplatten der Magnetrührer auf ausgewählte Temperaturen (22, 26, 28 und 31°C) beheizt.

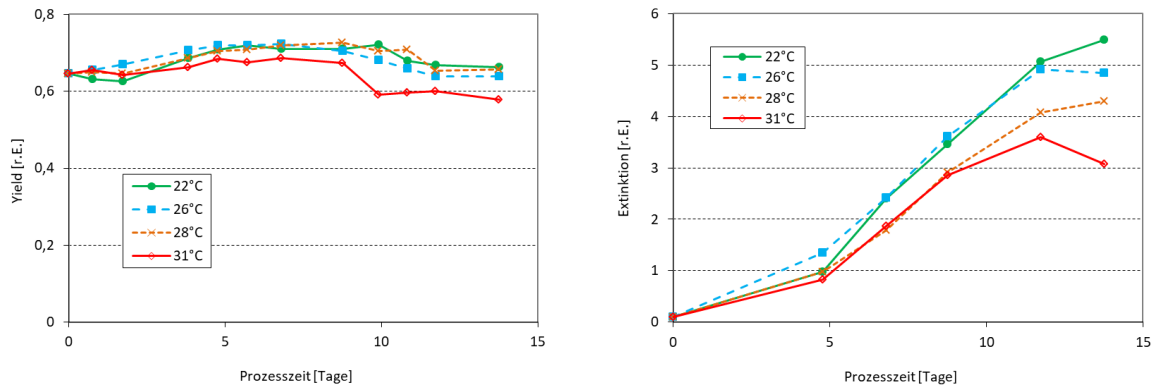


ABB. 22 YIELD UND OD VON *ISOCHRYSIS* BEI UNTERSCHIEDLICHEN KULTIVIERUNGSTEMPERATUREN

Aus Abb. 22 ist ersichtlich, dass die unterschiedlichen Temperaturen nur geringen Einfluss auf den Yield der Kulturen hatten. Dieser Parameter bleibt über die gesamte Versuchslaufzeit bei allen Ansätzen bei einem Wert von über 0,6, was für gute bis ausreichende Wachstumsbedingungen spricht. Es fällt aber auf, dass Yield der Kultur mit der höchsten Temperatur über fast den gesamten Versuchszeitraum unterhalb dem der anderen Ansätze bleibt, somit kann davon ausgegangen werden, dass diese Temperatur die Zellen im gewissen Grad bei ihrer Photosynthese behindert.

Hinsichtlich der OD fallen Unterschiede zwischen den vier Ansätzen auf. Die Zunahme in der OD ist in den Ansätzen mit 28 und 31°C geringer als in den anderen beiden. Die höchste OD erzielte der Ansatz mit 22°C. Damit lässt sich sagen, dass das Temperaturoptimum von *Isochrysis* (unter den hier gegebenen Bedingungen) bei 22 – 26 °C liegt.

#### *TETRASELMIS* TEMPERATUR

Auch für *Tetraselmis* sollte der optimale Temperaturbereich für die Kultivierung bestimmt werden. Der Versuchsaufbau war mit dem, der bei *Isochrysis* verwendet wurde identisch – lediglich bei den gewählten Temperaturen gab es leichte Unterschiede: die Kulturen wurden auf 15,20, 25 und 30°C eingeregelt.

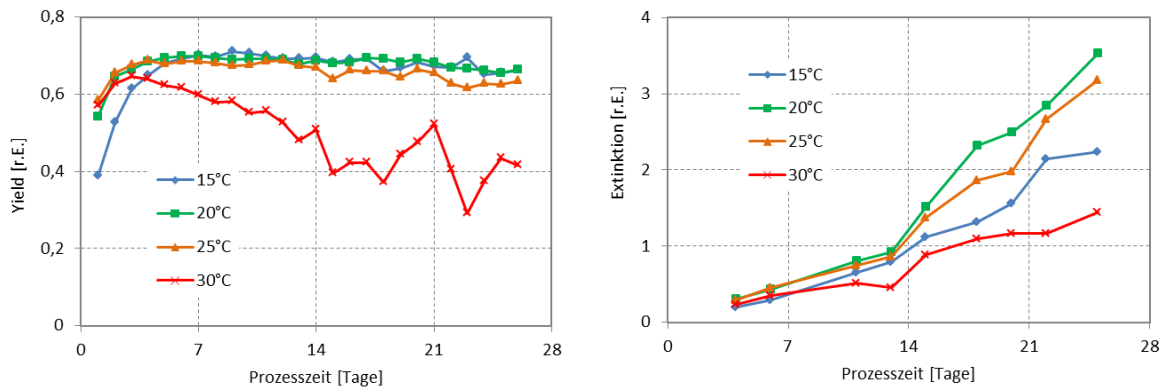


ABB. 23 YIELD UND OD VON *TETRASELMIS* BEI UNTERSCHIEDLICHEN KULTIVIERUNGSTEMPERATUREN

Bei der Betrachtung der Darstellung des Yields von *Tetraselmis* bei der Kultivierung unter unterschiedlichen Temperaturen fällt auf, dass der Yield des 30°C-Ansatzes schon kurz nach Versuchsbeginn anfängt zu sinken. Bis zum Versuchsende fällt dieser Wert auf 0,4, während alle anderen Ansätze einen gleichbleibend hohen Yield von ca. 0,7 aufweisen.

Auch in der OD bleibt der Ansatz mit 30°C deutlich hinter den anderen Ansätzen zurück. Am Ende des Versuches hat der Ansatz mit 20°C die höchste OD erreicht (3,5), gefolgt von dem Ansatz mit 25°C (3,2). Der Ansatz mit 15°C bleibt hinter diesen beiden zurück – er erreicht lediglich eine OD von 2,2. Der 30°C-Ansatz weist zwar eine kontinuierliche Zunahme in der OD auf, er erreicht allerdings nur eine OD von 1,5.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass das Temperaturoptimum für *Tetraselmis* zwischen 20 und 25°C liegt.

Für *Rhodomonas* wurde mit einem identischen Versuchsaufbau ebenfalls ein Temperaturoptimum zwischen 20 und 25°C ermittelt.

---

### KORRELATION ZWISCHEN ZELLZAHL UND OPTISCHER DICHTE

---

Aus einer Kombination von Messungen der Zellzahl (Auszählung am Mikroskop) und der optischen Dichte (Photometer) konnten für alle 3 Algenarten Korrelationskurven zwischen diesen beiden Parametern erstellt werden (vgl. Abb. 24 und Abb. 25). Dies erleichterte im weiteren Projektverlauf die Bestimmung der Zellzahl welche für die Verfolgung der Algenproduktion und Dosierung der Algensuspensionen zur Copepodenfütterung wesentlich ist. Die Ergebnisse wurden an die Projektpartner ZMT und GMA übertragen um auch dort für die Bestimmung der Zellzahl auf mikroskopische Zählungen verzichten und auf einfach durchzuführende Photometermessungen zurückgreifen zu können.



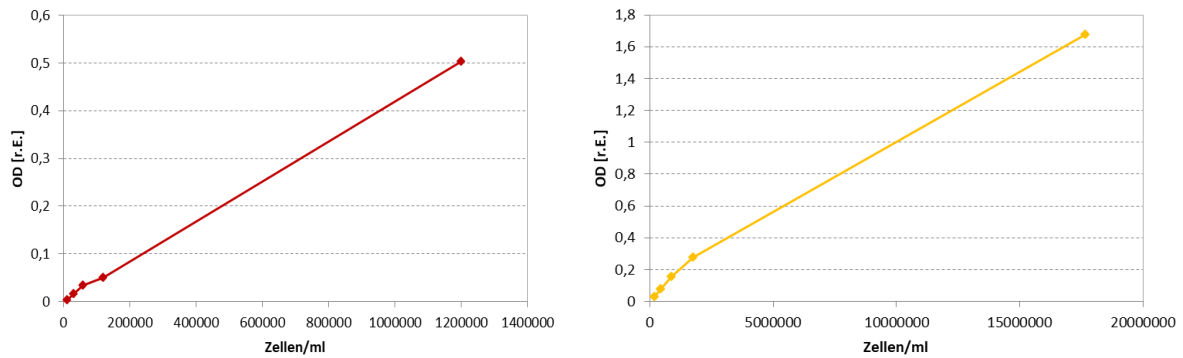


ABB. 24 KORRELATION VON ZELLZAHL ZU OD VON *RHODOMONAS* (LINKS) UND *ISOCHRYSIS* (RECHTS)

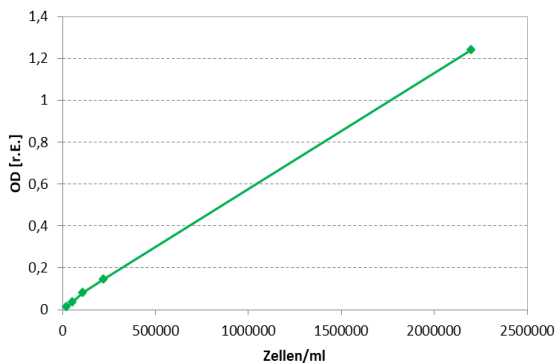


ABB. 25 KORRELATION ZELLZAHL ZU OD VON *TETRASELMIS*

---

### LAGERFÄHIGKEIT DER 3 AUSGEWÄHLTEN ALGENARTEN IM KÜHLSCHRANK

---

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit sich die normalen Kulturen der ausgewählten Algenarten lagern lassen. Das bestimmt die Frequenz mit der später frische Algen zur Versorgung der Copepodenproduktion bereitgestellt werden müssen. In Abhängigkeit davon können die Produktionszyklen und die Versandkosten optimiert werden.

Dazu wurden aus drei vitalen Kulturen von *Rhodomonas*, *Tetraselmis* und *Isochrysis* je 50 ml in ein Probenröhrchen (Falcon) überführt und anschließend in den Kühlschrank gelegt. Dabei wurde auf annähernd gleiche ODs geachtet. Mit ODs um 0,7 waren die Kulturen relativ dünn. Die Falcons wurden täglich geschwenkt, um abgesetzte Zellen wieder aufzuwirbeln. Die Vitalität der Zellen wurde mittels PAM bestimmt.

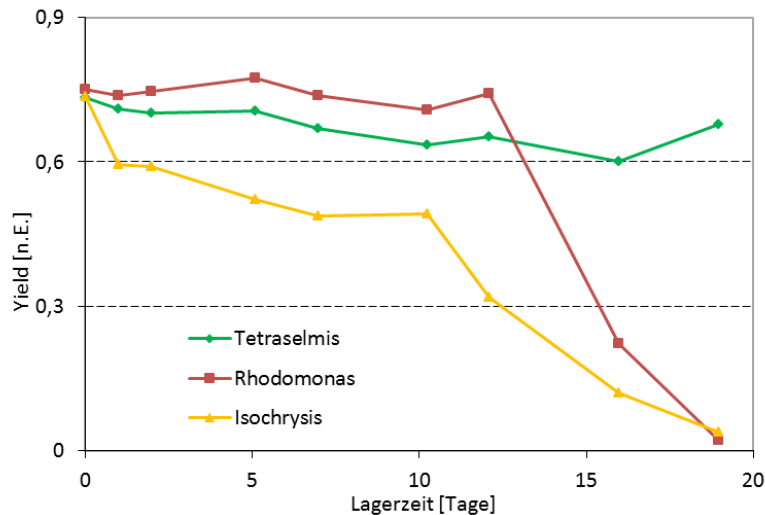


ABB. 26 YIELD VON *TETRASELMIS*, *RHODOMONAS* UND *ISOCHRYSIS* (KULTUREN) BEI LAGERUNG IM KÜHLSCHRANK

Aus Abb. 26 wird deutlich, dass die Zellen von *Tetraselmis* und *Rhodomonas* bei einer Lagerung im Kühlschrank über einen Zeitraum von 12 Tagen kaum an Vitalität verlieren. Der Yield dieser beiden Kulturen bleibt annähernd gleich hoch. Ab dem zwölften Tag beginnt der Yield der *Rhodomonas*-Kultur stark an zu sinken, und die Kultur verändert die Farbe von rot hin zu pink, was auf eine Lyse der Zellen hinweist. Am 18. Tag hat *Rhodomonas* einen Yield nahe Null.

Bei *Isochrysis* sinkt der Yield in den ersten 12 Tagen erst schwach. Dann sinkt der Wert schneller ab. Nach 18 Tagen hat auch *Isochrysis* nur noch einen Yield knapp über Null.

Damit kann davon ausgegangen werden, dass *Tetraselmis* sehr gut im Kühlschrank lagerfähig ist, während für *Isochrysis* und *Rhodomonas* die Haltbarkeit zeitlich deutlich begrenzter ist.

#### LAGERFÄHIGKEIT VON *RHODOMONAS*-KONZENTRAT IM KÜHLSCHRANK

Da hohe Zellzahlen i.A. kürzere Haltbarkeiten bedeuten, wurde aus einer vitalen *Rhodomonas*-Kultur ein Konzentrat hergestellt. Dazu wurde ein Falcon (50ml) mit Algenkultur befüllt und zentrifugiert (Becherzentrifuge, 5 Minuten ohne Bremse, bei 10°C). Das Pellet wurde mit 3 ml kalten Seewasser (AM32) resuspendiert und dann im Kühlschrank schräg liegend gelagert.

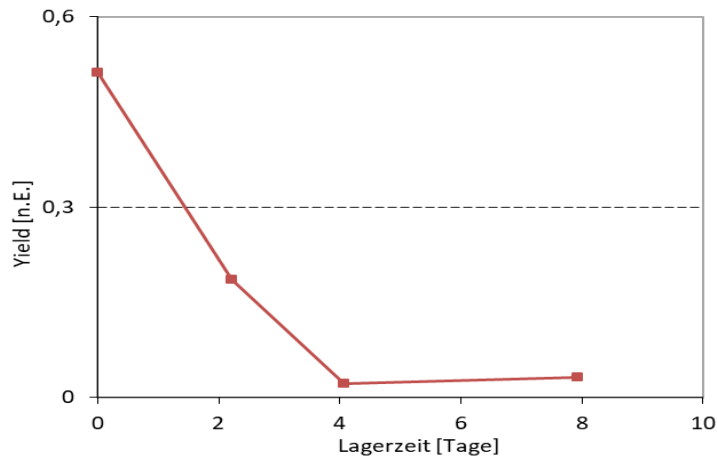


ABB. 27 YIELD VON KONZENTRAT AUS *RHODOMONAS* BEI LAGERUNG IM KÜHLSCHRANK

Aus diesem Versuch ist ersichtlich, dass die Haltbarkeit von *Rhodomonas* deutlich abnimmt, wenn die Kultur aufkonzentriert wird.

Ein Vergleich der Darstellungen Abb. 26 und Abb. 27 verdeutlicht dies. Der Yield des *Rhodomonas*-Konzentrates sinkt wesentlich schneller ab als der der gelagerten Kultur. Beim Konzentrat ist der Yield schon nach 4 Tagen nahe Null - im Gegensatz zur Kultur, die erst nach 18 Tagen keinen Yield mehr hatte.

#### LAGERFÄHIGKEIT VON KONZENTRATEN AUS *ISOCHRYSIS* UND *TETRASELMIS* IM KÜHLSCHRANK

Auch für *Tetraselmis* und *Isochrysis* wurde die Lagerfähigkeit von aufkonzentrierten Kulturen untersucht. Die Konzentratherstellung und Lagerung wurde wie bei *Rhodomonas* durchgeführt.

In Abb. 28 sind die gemessenen Yield-Werte der beiden Konzentrate über die Lagerzeit dargestellt. Es wird deutlich, dass der Yield von *Tetraselmis* nur langsam sinkt, selbst nach ca. 35 Tagen lag der Yield hier noch bei 0,5. Erst nach 55 Tagen hatte das *Tetraselmis*-Konzentrat nur noch einen Yield nahe 0.

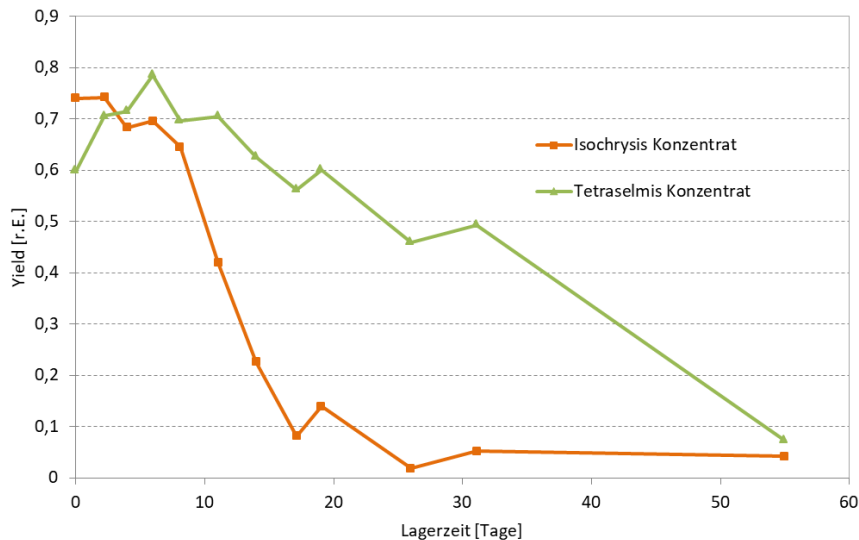


ABB. 28 YIELD VON KONZENTRATEN AUS *TETRASELMIS* UND *ISOCHRYSIS* BEI LAGERUNG IM KÜHLSCHRANK

Der Yield des *Isochrysis*-Konzentrates hingegen beginnt schon nach ca. zehn Tagen stark zu sinken und ist bereits nach 18 Tagen unter 0,1.

Damit lässt sich *Tetraselmis* gut über einen längeren Zeitraum in aufkonzentrierter Form lagern. Konzentrate aus *Isochrysis* haben eine geringere Lagerfähigkeit sind aber für den Versand und anschließenden Einsatz beim Kunden ausreichend lagerfähig.

---

### UNTERSUCHUNGEN ZUR LAGERFÄHIGKEIT VON *RHODOMONAS* SP.

---

*Rhodomonas* ist als Futteralge für die Aquakultur von großer Bedeutung. Die Larvenzüchter haben allerdings nur begrenzt die Möglichkeit große Mengen bzw. hohe Zellzahlen an *Rhodomonas* selber vor Ort zu kultivieren. Ein Transport von großen Mengen an Algenkultur zu den Larvenzüchtern ist zudem wirtschaftlich unrentabel. Da *Rhodomonas* im Vergleich zu *Isochrysis* eine durchgehend schlechtere Haltbarkeit aufwies, wurden deshalb verstärkt Untersuchungen zum Downstream, Aufkonzentrierung und zur Lagerung von *Rhodomonas* durchgeführt.

---

### EINFRIEREN VON *RHODOMONAS*

---

Eine Möglichkeit Algenzellen für längere Zeit vorzuhalten besteht – bei gewissen Algen wie z.B. *Nannochloropsis* – darin, die aufkonzentrierten Algen bei -20°C zu lagern.

Daher wurden einige Versuche durchgeführt, in denen *Rhodomonas*kulturen - mit relativ geringer Zelldichte – eingefroren wurden.

## LAGERUNG VON *RHODOMONAS* BEI -20 BZW. -80°C

---

Zunächst wurden dazu je 10 ml einer vitalen *Rhodomonas*-Kultur für 24 Stunden eingefroren. Ein Ansatz bei -20°C, der andere bei -80°C.

Nach dem Auftauen sind in beiden Ansätzen lediglich Zellfragmente erkennbar. Der Yield ist bei beiden Ansätzen nahe 0. Somit kann *Rhodomonas* nicht – ohne weiteres – eingefroren werden.

## LAGERUNG VON *RHODOMONAS* BEI -20°C MIT GLYCEROL ALS ANTIFROSTMITTEL

---

Da im ersten Versuch eventuell die schnelle Eiskristallbildung die Zellen von *Rhodomonas* zerstörte, wurden Überlegungen zu möglichen Gefrierschutzmitteln angestellt. Als unbedenklicher, neutraler und gut wasserlöslicher Wirkstoff wurde Glycerol zu diesem Zweck ausgewählt.

Ein erster Versuch mit Glycerol als Antifrostmittel wurde wie folgt durchgeführt:

- A) 9 ml Kultur + 1 ml Glycerol
- B) 5 ml Kultur + 5 ml Glycerol
- C) 1 ml Kultur + 9 ml Glycerol

Direkt nach dem Ansetzen wurden die Proben mikroskopisch untersucht. Im Ansatz A) waren schöne, rote, bewegliche Zellen vorhanden. B) färbte sich pink und es waren lediglich nur noch grüne Zellfragmente erkennbar. C) war so stark verdünnt, dass es farblos wirkte und Zellen kaum zu finden waren.

Alle Ansätze wurden für 24 Stunden bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen fanden sich lediglich im Ansatz mit 1 ml Glycerol-Zugabe noch einige wenige rote und intakte Zellen. Glycerol kann damit eventuell die Lagerfähigkeit von *Rhodomonas* (bei -20°C) erhöhen. Dabei scheint eine Konzentration von 1/10 Glycerol am besten geeignet. Eine zu hohe Konzentration an Glycerol, führt zur Lyse der Zellen. Dies wird u.A. durch verstärkten osmotischen Druck des Glycerols auf die Zellen verursacht.

## LAGERUNG VON *RHODOMONAS* BEI -20°C MIT UNTERSCHIEDLICHEN BEHANDLUNGEN MIT GLYCEROL

---

Da sich herausgestellt hatte, dass ein Einfrieren von *Rhodomonas* bei Zugabe von Glycerol möglich ist, wurde ein weiterer Versuch zu diesem Thema durchgeführt. Dabei wurden sowohl unterschiedliche Glycerolkonzentrationen gewählt, bzw. teilweise das Glycerol zunächst der Kultur zugegeben und diese somit für einen gewissen Zeitraum mit dem Antifrostmittel inkubiert, um eine Aufnahme des Glycerols ins Zellinnere zu ermöglichen.

- a) 9,9 ml Rho + 0,1 ml Glycerol - 1 h bei Raumtemp. inkubieren, dann in – 20°C
- b) 9,9 ml Rho + 0,1 ml Glycerol - direkt in -20°C
- c) 9,0 ml Rho + 1,0 ml Glycerol - 1h bei Raumtemp. inkubieren, dann in -20°C
- d) 9,0 ml Rho + 1,0 ml Glycerol - direkt in -20°C
- e) Kontrolle: 10 ml Rho direkt in -20°C

Die Ansätze verblieben für 24 h bei – 20°C. Nach dem Auftauen und weiteren 24 h Lagerung im Kühlschrank waren lediglich in den Ansätzen mit 1 ml Glycerol noch einige rote Zellen vorhanden. Im Gegensatz zu den anderen Ansätzen war hier der Yield der Zellen noch über 0 (0,2 und 0,3). Vor allem eine Inkubation der Algenzellen mit Glycerol scheint die Lagerfähigkeit zu erhöhen. Vermutlich sind die Zellen in der Lage, das Glycerol aktiv in ihren Stoffwechsel einzubauen, bzw. das Glycerol gelangt durch Osmose in die Zellen und wirkt dort als Frostschutz.

#### LAGERUNG VON *RHODOMONAS* BEI -20°C NACH UNTERSCHIEDLICH LANGEN INKUBATIONSZEITEN MIT GLYCEROL

---

Da aus dem vorherigen Versuch ein tendenziell positiver Einfluss einer Inkubation der *Rhodomonas*-Zellen mit Glycerol zu erkennen war, wurde ein detaillierterer Versuch dazu durchgeführt:

- a) 9 ml Rho + 1 ml Glycerol, 5 Stunden inkubieren, dann in -20°C
- b) 9,9 ml Rho + 0,1 ml Glycerol, 5 Stunden inkubieren, dann in -20°C
- c) 10 ml Rho normal direkt in -20°C
- d) 10 ml Rho mit Glycerol kultiviert (0,1 molar) direkt in -20°C

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur waren lediglich im Ansatz a) noch vitale Zellen vorhanden. Damit scheint ein Zusatz von Glycerol von 1:10 zu einer *Rhodomonas*kultur deren Lagerfähigkeit – selbst bei 24 stündigem Einfrieren bei -20°C – deutlich zu verbessern. Selbst nach 14 Tagen im KS wurden in diesem Ansatz immer noch lebende, bewegliche Zellen beobachtet, wobei ein Yield von 0,3 zu diesem Zeitpunkt auf ein Absterben der Zellen oder eine generell schlechte photosynthetische Aktivität hinwies.

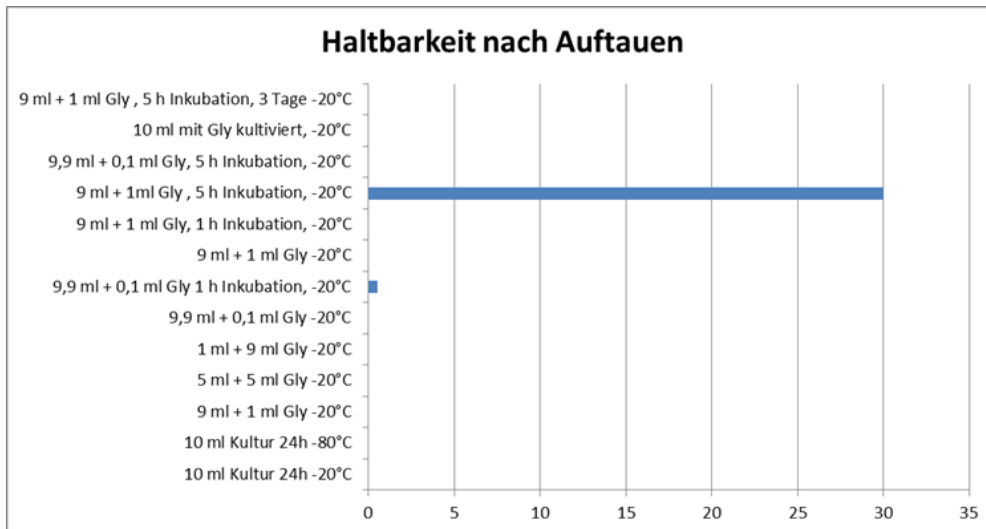


ABB. 29 ÜBERSICHT ÜBER DIE HALTBARKEIT VON *RHODOMONAS*

Aus Abb. 29 wird deutlich, dass durch eine Inkubation von *Rhodomonas* mit 10% Glycerol eine Haltbarkeit im Kühlschrank von bis zu 30 Tagen erreicht werden kann. Dabei ist die Zeit bei -20°C auf 24 Stunden beschränkt – bei längerer Verweildauer werden die Zellen von *Rhodomonas* irreversibel geschädigt.

#### LAGERUNG VON *RHODOMONAS* – BEI VORHERIGER KULTIVIERUNG MIT UND OHNE GLYCEROL

Da Glycerol die Lagerfähigkeit von *Rhodomonas* selbst bei kurzzeitigem Einfrieren bedeutend verlängerte, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, in welchem *Rhodomonas* mit Glycerol im Medium kultiviert wurde.

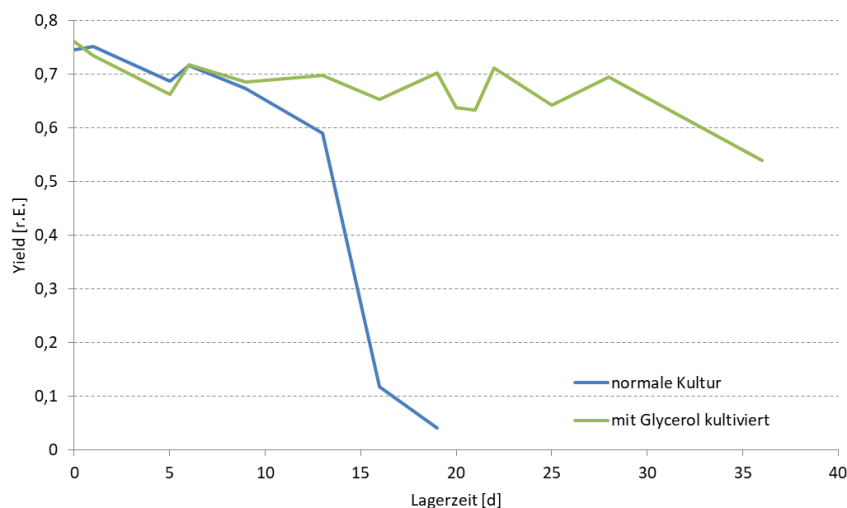


ABB. 30 UNTERSCHIEDE ZWISCHEN NORMALER KULTUR UND GLYCERIN-KULTUR BEI LAGERUNG IM KÜHLSCHRANK

Aus Abb. 30 wird deutlich, dass eine Kultiveringung von *Rhodomonas* mit Glycerol im Medium die Lagerfähigkeit der Kultur deutlich heraufsetzt. Während der Yield bei der normalen Kultur nach ca. 15 Tagen bereits nahe null ist, weisen die mit Glycerol kultivierten Zellen auch nach 35 Tagen noch einen Yield von über 0,5 auf. Dieses prinzipiell gute Ergebnis ist allerdings verbunden mit einem starken Bakterienwachstum in der Algenkultur da Glycerol von bestimmten Bakterien als Substrat genutzt werden kann. Bedingt durch das starke Bakterienwachstum wird das Licht aufgrund der starken Trübung des Wachstumsmediums für die Algen schlecht verfügbar und es kommt zu deutlich reduzierten Wachstumsraten der Algenkultur. Ausserdem müssen die Bakterien bei der Ernte von den Algenzellen getrennt werden um keinen Bakterieneintrag in die Copepodenkulturen zu verursachen.

Aufgrund der weitreichenden negativen Auswirkungen des Bakterienwachstums auf die geplante Anwendung der *Rhodomonas*kultur wurde der Ansatz im weiteren Projektverlauf nicht weiterverfolgt.

---

#### DOWNSTREAM UND LAGERFÄHIGKEIT VON *RHODOMONAS*KONZENTRATEN

---

Da mit den oben beschriebenen Versuchen eine verlängerte Haltbarkeit von *Rhodomonas* mittels einer Zugabe von Glycerol nachgewiesen werden konnte, sollten nachfolgend Versuche an Konzentraten von *Rhodomonas* durchgeführt werden.

Ziel der hier zusammengestellten Untersuchungen war es aus der Mikroalge *Rhodomonas* lagerfähiges Konzentrat herzustellen.

Das Aufkonzentrieren ist von wirtschaftlicher Bedeutung, da so die Kosten bei einem möglichen Versand gering gehalten werden können. Für einen europaweiten Versand ist es zudem von großer Bedeutung, dass die Zellen auch nach mehreren Tagen in Dunkelheit und ohne nennenswerte „Bewegung“ vital beim Kunden ankommen. Darüber hinaus wäre eine weitere Lagerfähigkeit beim Kunden wünschenswert.

---

#### ABSETZEN LASSEN

---

Die am wenigsten aufwändige Herstellung eines Konzentrates von *Rhodomonas* ist das Aufkonzentrieren der Algenkultur mittels passiver Sedimentation der Algenzellen.

Um zu überprüfen, ob ein derartiger Downstream möglich ist, wurden 250 ml einer vitalen *Rhodomonas*kultur in einen Standzylinder gegeben und für 24 Stunden in den Kühlschrank gestellt.

Nach 24 Stunden hatten sich die meisten Zellen am Boden des Zylinders abgesetzt. Dieses Konzentrat wurde mittels Pipette abgesaugt und in ein Falcon überführt. Das Konzentrat



hatte eine OD von 11,3. Der gemessene Yield von 0,325 deutete darauf hin, dass die Zellen entweder einen Teil ihrer photosynthetischen Aktivität verloren hatten oder dass ein Teil der Zellen bereits abgestorben war.

Da die Zugabe von Glycerol zum Konzentrat in vorherigen Versuchen einen positiven Einfluss auf die Haltbarkeit von *Rhodomonas* hatte, wurde auch diesem Konzentrat einige Mikroliter Glycerol zugefügt. Anschließend wurde das Falcon liegend im Kühlschrank gelagert.

Nach 24 Stunden hatte das Konzentrat eine pinke Farbe, was auf einen Zerfall der Algenzellen hindeutet. Der gemessene Yield von 0,0 bestätigte dieses.

Eine Wiederholung dieses Downstreams (5 Liter in einem Becherglas, 24 h im Kühlschrank) wurde durchgeführt. Nach 24 Stunden hatte sich ein Großteil der Algenzellen abgesetzt. Zwei Liter des Überstandes wurden abgegossen, die verbleibenden drei Liter wurden verrührt. Dieses Konzentrat hatte eine OD von 1,8 und einen Yield von 0,66. Damit zeigte sich, dass ein Downstream mittels Absinken-lassen der Zellen möglich ist, wenn die OD der Ausgangskultur und damit auch die des entstehenden Konzentrates nicht zu hoch ist.

#### DOWNSTREAM MITTELS ZENTRIFUGATION – TECHNISCHE EINSTELLUNGEN

Um den Downstream zu beschleunigen wurden im weiteren Versuche zum Downstream mittels Zentrifugation durchgeführt. Als Behältnisse des zentrifugierenden Materials wurden Falcons (50 ml) verwendet. Die Zentrifuge wurde zunächst mit folgenden Einstellungen verwendet:

4000 rpm, bei 10°C für 15 Minuten

Dadurch entstanden recht feste Pellets aus Algenzellen, die nur relativ schwer wieder resuspendiert werden konnten. Versuche lagerfähige Konzentrate herzustellen endeten meist bereits nach vier Tagen.

Daraufhin wurden die Einstellungen der Zentrifuge variiert; es zeigte sich, dass (bei gleichen Behältnissen) mit 2000 rpm, bei 10°C für 5 Minuten die Zellen am Boden des Falcons zu einem Pellet zentrifugiert wurden, welches sich aber leicht wieder resuspendieren ließ.

In allen folgenden Versuchen wurde mit den neuen Zentrifugeneinstellungen gearbeitet.

#### KONZENTRATE AUS NORMALER KUKLTUR UND GLYCEROL-KULTUR

Da in vorherigen Untersuchungen ein positiver Effekt von Glycerol auf die Haltbarkeit von *Rhodomonas*-Kulturen festgestellt worden war, wurde ein neuer Versuch angesetzt, in dem die Haltbarkeit von *Rhodomonas*-Konzentraten untersucht werden sollte. Ein Ansatz wurde

mit normalem Medium kultiviert, der andere mit Medium, welchem einmalig Glycerol (Konzentration 9g/l) zugesetzt wird.

Nach einigen Tagen der Kultivierung, in denen beide Ansätze einen guten Yield und eine Zunahme der OD aufwiesen, wurden zwei Falcons mit den jeweiligen Kulturen befüllt und zentrifugiert.

Die entstandenen Pellets wurden mit 10 ml des jeweiligen Überstandes resuspendiert. Dem Konzentrat aus normaler Kultur wurden 100 µl Glycerol zugegeben.

Beide Falcons wurden für 3 ½ h im Schwachlicht bei Hallentemperatur inkubiert.

Die PAM-Messungen nach der Inkubation ergeben für das Konzentrat aus normaler Kultur mit Glycerol inkubiert einen Yield von 0,598 und für das Konzentrat aus Glycerol-Kultur einen Yield von 0,696.

Danach wurden beide Falcons schräg im Kühlschrank gelagert.

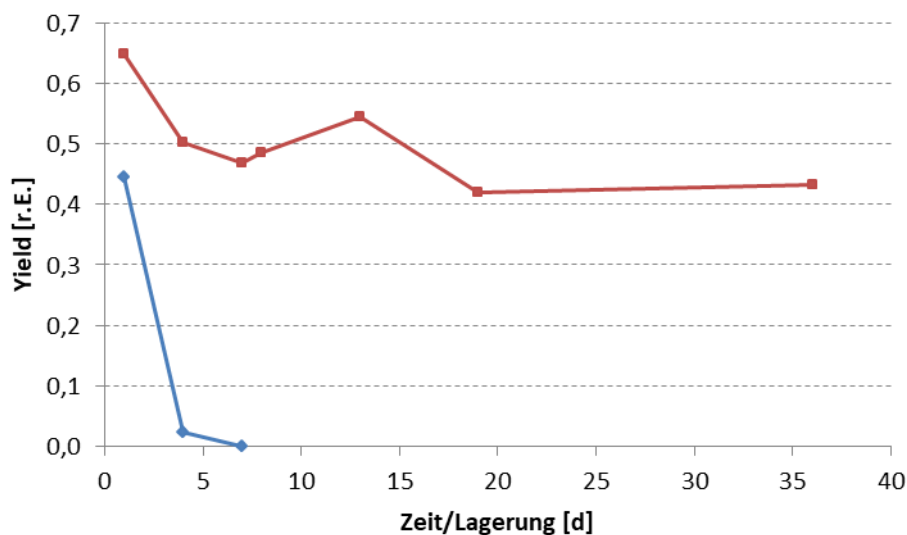


ABB. 31 HALTBARKEIT VON *RHODOMONAS*-KONZENTRAT AUS NORMALER KULTUR BZW. GLYCEROL-KULTUR

Aus Abb. 31 wird deutlich, dass das Konzentrat, welches aus Glycerol-Kultur hergestellt wurde (rot) deutlich länger haltbar ist, als das Konzentrat, welches aus einer Kultur aus normalem Medium (blau) hergestellt wurde, obwohl dieses ebenfalls mit Glycerol inkubiert worden war. Entscheidend scheint es also zu sein, dass die Zellen mit Glycerol kultiviert worden sind und so das Glycerol in die Zellen eingebaut werden konnte.

## KONZENTRATE AUS NORMALER KULTUR UND VERSCHIEDENEN GLYCEROLKULTUREN

Um das Ergebnis zu verifizieren, wurden erneut Konzentrate aus unterschiedlichen Kulturen hergestellt:

- Normale Kultur
- Kultur mit einmaliger Glycerol-Zugabe zu Beginn der Kultivierung
- Kultur, der alle zwei Tage Glycerol zugesetzt wurde

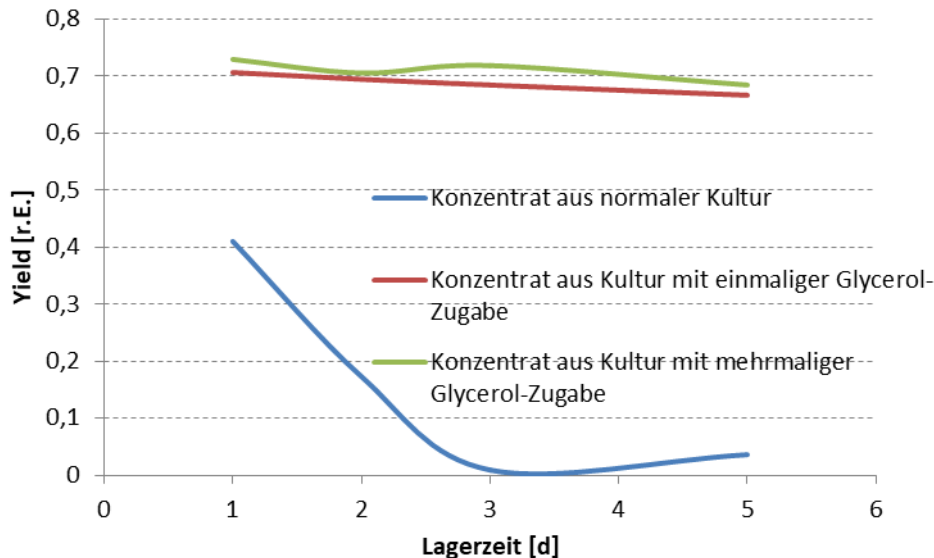


ABB. 32 YIELD DER KONZENTRATE AUS NORMALER KULTUR BZW. KULTUR, DIE EINMALIG BZW. MEHRMALS GLYCEROL WÄHREND DER KULTIVIERUNG ERHALTEN HAT

Auch in diesem Ansatz konnte eine deutlich verlängerte Lagerfähigkeit von Konzentraten die aus Glycerol-Kulturen hervorgingen festgestellt werden. Dabei war kein Unterschied zwischen einmaliger bzw. mehrmaliger Glycerolzugabe zu erkennen.

### UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DES ZEITPUNKTES DER PROBENNAHME AUF DIE LAGERFÄHIGKEIT (KULTUREN)

Da aus früheren Untersuchungen bekannt war, dass es sich positiv auf die Haltbarkeit des Konzentrates auswirken kann, wenn der Downstream über Nacht stattfindet, wurden hier erneute Untersuchungen zu diesem Thema angestellt. Dabei wurde mit Kulturen gearbeitet, um einen möglichen negativen Effekt der Zentrifugation auszuschließen.

Es wurden zu drei unterschiedlichen Zeiten (kurz nach Beginn der Lichtphase, mitten während der Lichtphase und kurz vor Ende der Lichtphase) jeweils zwei Proben aus einer vitalen *Rhodomonas*-Kultur entnommen. Je eine der Proben wurde dann im Kühlschrank gelagert (+5°C), die anderen wurden bei Hallentemperatur (20°C) und ebenfalls im Dunkeln gelagert.

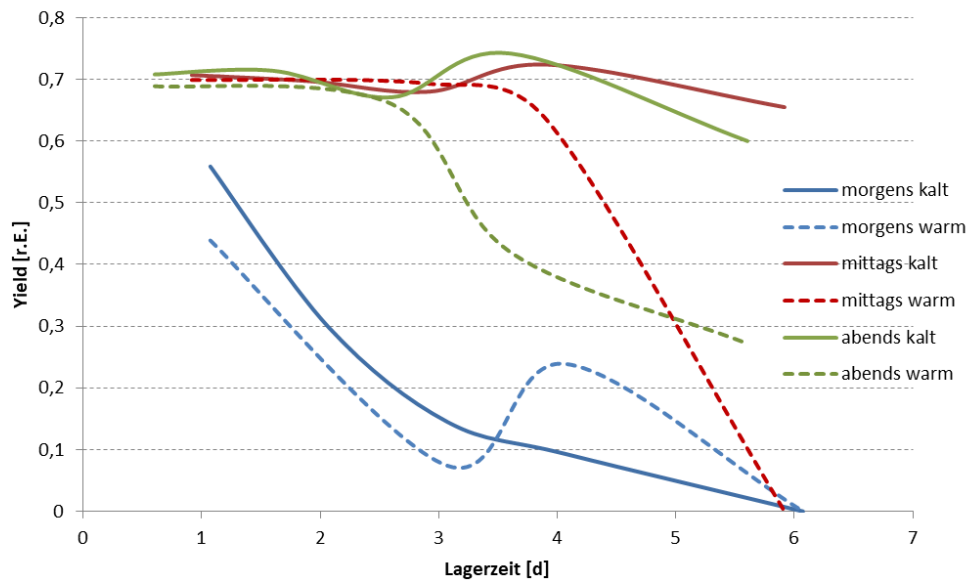


ABB. 33 LAGERFÄHIGKEIT VON *RHODOMONAS*KULTUREN BEI UNTERSCHIEDLICHEN TEMPERATUREN UND BEI UNTERSCHIEDLICHEN ZEITEN DER PROBENNÄHME

Aus Abb. 33 wird deutlich, dass sich eine Probennahme kurz nach Beginn der Lichtphase negativ auf die Haltbarkeit der Kultur auswirkte – unabhängig davon, ob die Probe kühl oder warm gelagert wurde.

Länger haltbar waren die mittags bzw. abends gezogenen Proben, wobei sich hier die Lagerung im Kühlschrank deutlich positiv auf die Lagerfähigkeit auswirkte.

Dieser Versuch wurde mit einer Kultur wiederholt, die erst vier Tage zuvor mit 50% frischem Medium verdünnt worden war.

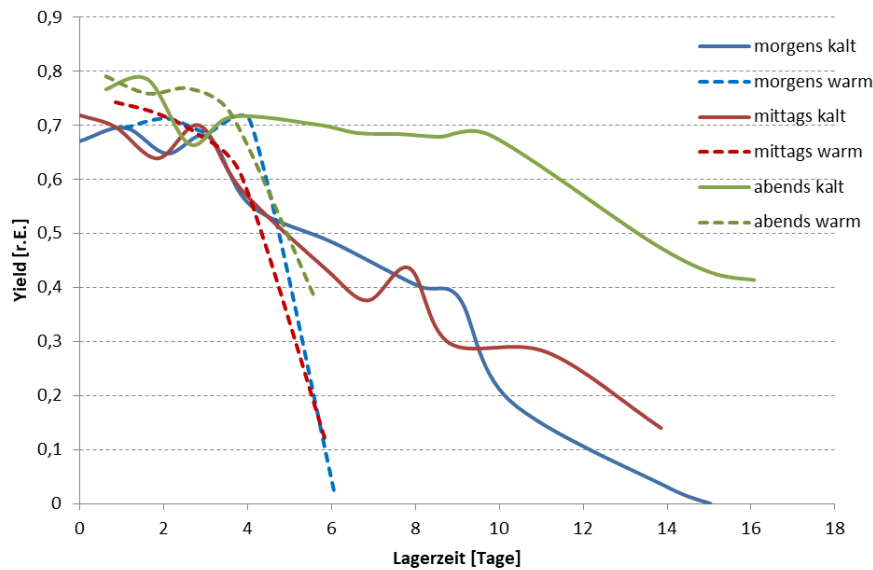


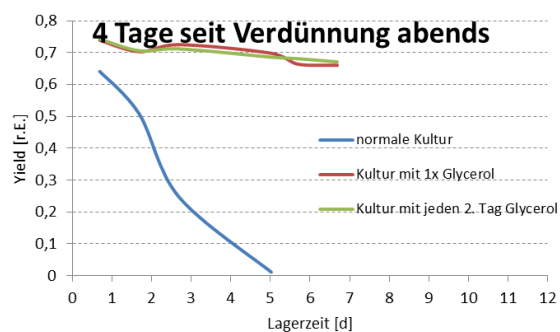
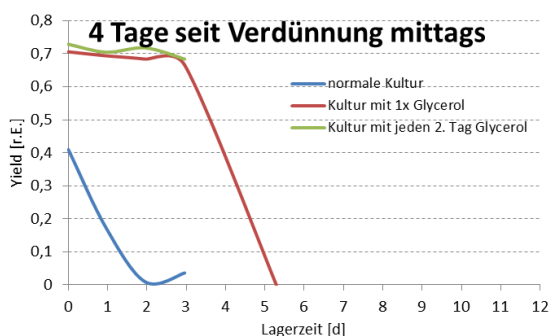
ABB. 34 LAGERFÄHIGKEIT VON *RHODOMONAS*KULTUREN BEI UNTERSCHIEDLICHEN TEMPERATUREN UND BEI UNTERSCHIEDLICHEN ZEITEN DER PROBENNÄHME – DIE KULTUR WURDE 3 TAGE VOR DOWNSTREAM MIT 50% FRISCHEM MEDIUM VERSETZT

Aus Abb. 34 wird deutlich, dass auch in diesem Versuch eine Lagerung im Kühlschrank deutlich besser ist, als warm. Die warm gelagerten Kulturen hatten bereits nach sechs Tagen einen Yield nahe 0. Die abends gezogenen Proben hatten auch hier wieder eine deutlich längere Haltbarkeit als die morgens bzw. mittags gezogenen Proben.

#### AUSWIRKUNGEN DES KULTURALTERS AUF DIE LAGERFÄHIGKEIT VON *RHODOMONAS*

Im vorherigen Versuch hatte sich herausgestellt, dass sich die Lagerfähigkeit von *Rhodomonas* verlängert, wenn die Probennahme bzw. der Downstream kurz vor bzw. kurz nach Ende der Lichtphase durchgeführt wird.

Ein weiterer Faktor, der sich auf die Lagerfähigkeit von *Rhodomonas* auswirken könnte, ist das Alter der Kultur. Daher wurde ein Versuch durchgeführt, in dem Konzentrate aus drei verschiedenen Kulturen (normal, mit 1x Glycerol, mit mehrmals Glycerol) an verschiedenen Kultivierungstagen hergestellt wurden.



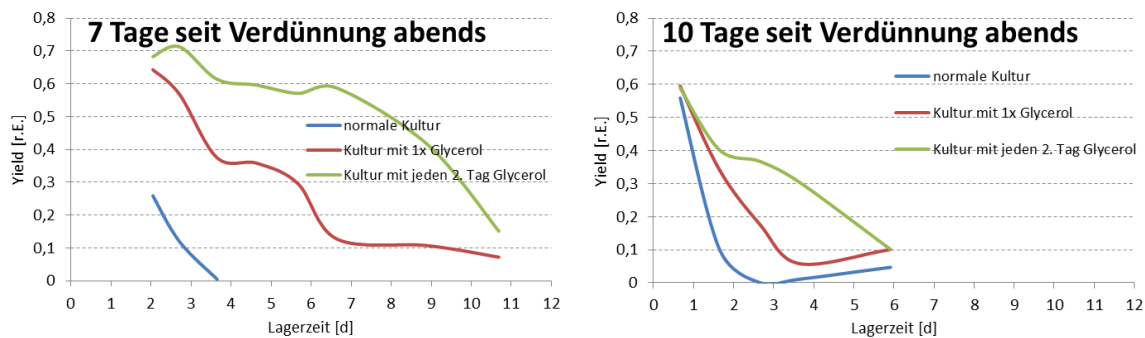


ABB. 35 ERGEBNISSE DER YIELD-MESSUNGEN AN KONZENTRATEN AUS UNTERSCHIEDLICHEN KULTUREN - IN ABHÄNGIGKEIT DES ALTERS DER KULTUREN

Aus Abb. 35 wird ersichtlich, dass auch hier die Konzentrate der Glycerol-Kulturen eine längere Lagerfähigkeit aufweisen. Sehr deutlich wird aus den oberen beiden Graphiken, dass ein Downstream kurz am Ende der Hellphase eine deutliche Verbesserung der Lagerfähigkeit nach sich zieht (im Gegensatz zu einem Downstream in der Mitte der Hellphase).

Bei Betrachtung aller Darstellungen wird deutlich, dass eine relativ junge Kultur (hier 4 Tage) für einen Downstream vorzuziehen ist. In den Konzentraten, die aus Kulturen hergestellt worden waren, deren Verdünnung länger her war (7 bzw. 10 Tage) sinkt der Yield schneller ab.

#### EINFLUSS DER ZUGABE VON O<sub>2</sub> AUF DIE LAGERFÄHIGKEIT VON *RHODOMONAS*-KONZENTRATEN

Um zu untersuchen, ob die Haltbarkeit von *Rhodomonas*-Konzentraten durch die Zugabe von Sauerstoff verlängert werden kann, wurden zwei *Rhodomonas*-Kulturen angelegt. Einen Tag vor der Konzentrat-Herstellung wurde eine der beiden mit 2/3 neuem Medium verdünnt (frische Kultur). Für die Ansätze mit O<sub>2</sub> wurde 3 Minuten reiner Sauerstoff in das Konzentrat geblubbert. Die Sauerstoffkonzentration wurde dabei auf 300% erhöht.

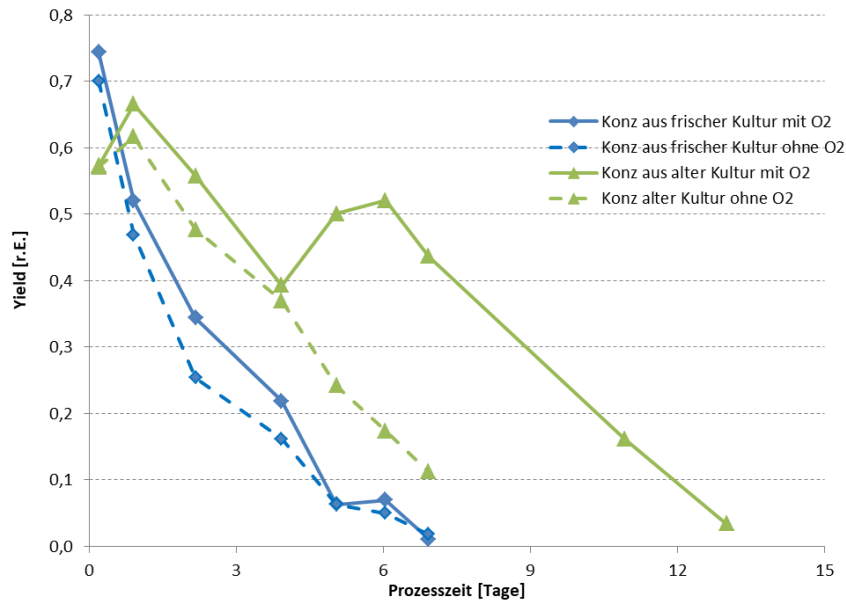


ABB. 36 YIELD VON *RHODOMONAS*-KONZENTRATEN (AUS KULTUREN UNTERSCHIEDLICHEN ALTERS) MIT UND OHNE SAUERSTOFF

Die Ergebnisse der PAM-Messungen an den Konzentraten (Abb. 36) zeigt für die Konzentrate aus frisch verdünnter Kultur keinen Unterschied zwischen normaler und sauerstoff-aufgesättigter Lagerung. Der Yield dieser Konzentrate ist bereits nach fünf Tagen nahe Null.

Bei den Konzentraten aus „alter“ Kultur scheint sich eine Zugabe von Sauerstoff aber durchaus positiv auszuwirken. Im Konzentrat ohne zusätzlichen Sauerstoff ist der Yield bereits nach sieben Tagen auf 0,1 abgesunken. Im Konzentrat mit zusätzlichem Sauerstoff wird dieser Wert erst nach 12 Tagen erreicht.

## ZUSAMMENFASSUNG DER LAGERUNG VON *RHODOMONAS*-KONZENTRATEN

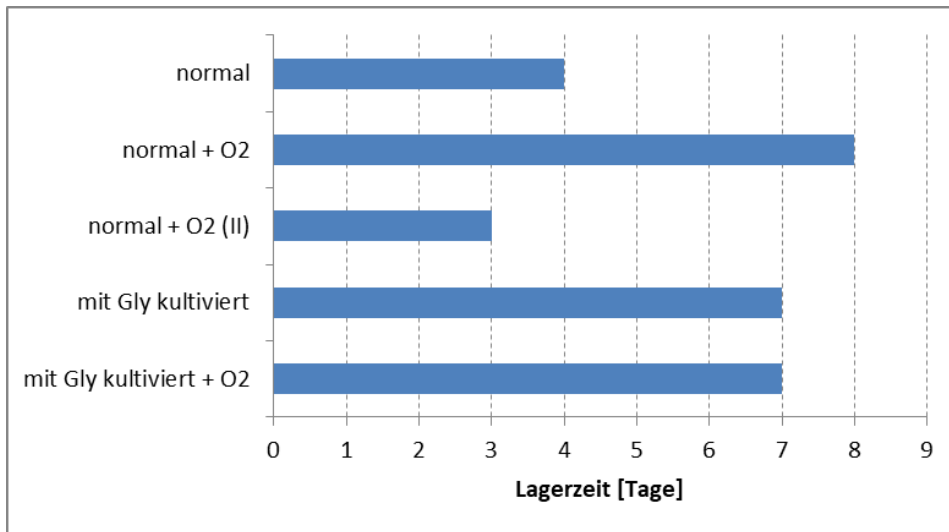


ABB. 37 ZUSAMMENFASSUNG DER LAGERUNG VON *RHODOMONAS*-KONZENTRATEN

Eine Zusammenfassung der verschiedenen durchgeführten Maßnahmen zur Erhöhung der Lagerfähigkeit von *Rhodomonas* Konzentrat zeigt deutliche positive Effekte von Glycerol und mögliche positive Effekte von O<sub>2</sub>. Da sich die positiven Effekte von O<sub>2</sub> im Rahmen dieses Projektes nicht zuverlässig reproduzieren ließen wurde der Ansatz im Upscaling nicht weiterverfolgt.

Die prinzipiell guten Ergebnisse mit Glycerol sind allerdings verbunden mit einem starken Bakterienwachstum in der Algenkultur da Glycerol von bestimmten Bakterien als Substrat genutzt werden kann. Bedingt durch das starke Bakterienwachstum wird das Licht aufgrund der starken Trübung des Wachstumsmediums für die Algen schlecht verfügbar und es kommt zu deutlich reduzierten Wachstumsraten der Algenkultur. Ausserdem müssen die Bakterien bei der Ernte von den Algenzellen getrennt werden um keinen Bakterieneintrag in die Copepodenkulturen zu verursachen.

Aufgrund der weitreichenden negativen Auswirkungen des Bakterienwachstums auf die geplante Anwendung des *Rhodomonas* Konzentrates wurde der Ansatz im weiteren Projektverlauf nicht weiterverfolgt.

## UPSCALE DER DOWNSTREAMPROZESSE

In enger Zusammenarbeit mit den Projektpartnern wurden regelmäßig Starterkulturen und Medium an das ZMT geschickt, um dort vor Ort direkt Algen für die Copepodenaufzucht zu kultivieren. So waren die Algen immer frisch und es traten keine evtl. Zellschädigungen durch den Versand von Buisum nach Bremerhaven auf.



Die Zellkonzentration ist dabei allerdings gering und es werden erhebliche Mengen an Kultivierungsmedium in das System eingebracht was nachteilig für eine hohe Copepodenkonzentration ist. Um das Projektziel einer dichten Copepodenzucht zu realisieren werden große Mengen an Algenzellen pro Volumen benötigt. Optimal wäre es deshalb, die Algenzellen im großen Maßstab aufzukonzentrieren. So wäre auch eine dezentrale Algenproduktion möglich, bei der regelmässig aufkonzentrierte Algen an den Ort der Copepodenproduktion geschickt werden.

Für das Upscaling der Aufkonzentration wurden deshalb im Projektverlauf umfangreiche Experimente mit kontinuierlichen Durchflußzentrifugen, Cross Flow Filtration und Sedimentation durchgeführt. Aufgrund des hohen Fettgehaltes und der geringen Größe der Algenzellen sind starke Zentrifugalkräfte notwendig um die Algenzellen mit realistischem Volumendurchsatz zu sedimentieren.

Die zur Untersuchung der Lagerfähigkeit von Konzentraten eingesetzten Becherzentrifugen sind für alle untersuchten Algenarten prinzipiell sehr geeignet und die Zellen werden nicht beschädigt. Becherzentrifugen arbeiten allerdings im nicht kontinuierlichen Batch Modus und können Volumina von max 5L pro Durchlauf verarbeiten. Für ein kommerziell relevantes Upscale der Ernte und Aufkonzentrierung sind deshalb kontinuierlich arbeitende Durchlaufzentrifugen notwendig die bis zu 500L pro Stunde verarbeiten können.

*Tetraselmis* konnte mit der kontinuierlichen Zentrifugentechnik erfolgreich aufkonzentriert werden. Bei *Rhodomonas* und *Isochrysis* wurden in der Zentrifuge allerdings bis zu 20% der Zellen beschädigt und die Haltbarkeit der Konzentrate war eingeschränkt. Eine weitere Reduktion der Drehzahl und dem damit verbundenen hydrodynamischen Druck auf die Algen führte zu keiner Verbesserung der Resultate und verlängerte die Aufenthaltszeit der Algensuspension in der Zentrifuge auf unrealistische Werte. Die Aufkonzentration der *Rhodomonas*- und *Isochrysis*zellen mit einer kontinuierlichen Zentrifuge wurde deshalb im Projekt nicht weiterverfolgt.

Vielversprechend war dagegen die Verwendung der Cross Flow Filtration. Dabei werden die Algenzellen durch eine Kreislaufpumpe über eine Membran geführt. Die Porengröße der Membran wurde mit 10micron so gewählt daß die Algenzellen auf der Membran einen Filterkuchen aufbauen und nur zellfreies Medium durch die Membran hindurchtreten kann. So kommt es zu einer kontinuierlichen Aufkonzentration der Algensuspension. Anders als bei der normalen Filtration verhindert der konstante Volumenstrom über die Membranoberfläche allerdings ein Verblocken der Membran durch angesammelte Algenzellen so daß dieses Verfahren verfahrenstechnisch sehr geeignet ist. Direkt nach der Ernte waren auch bei

*Rhodomonas* und *Isochrysis* nahezu 100% der Zellen mikroskopisch intakt. Lagerversuche haben allerdings gezeigt daß es bei *Rhodomonas* zu lysierten Zellen innerhalb 4-5 Tagen kommt. Das lässt vermuten, daß die Zellen doch eine gewisse mechanische Schädigung bei der Cross Flow Filtration erfahren.

Für *Isochrysis* konnte in Lagerversuchen dagegen gezeigt werden, daß die Zellen auch im aufkonzentrierten Zustand nach Cross Flow Filtration eine Haltbarkeit von bis zu 11 Tagen im Kühlschrank aufweisen.

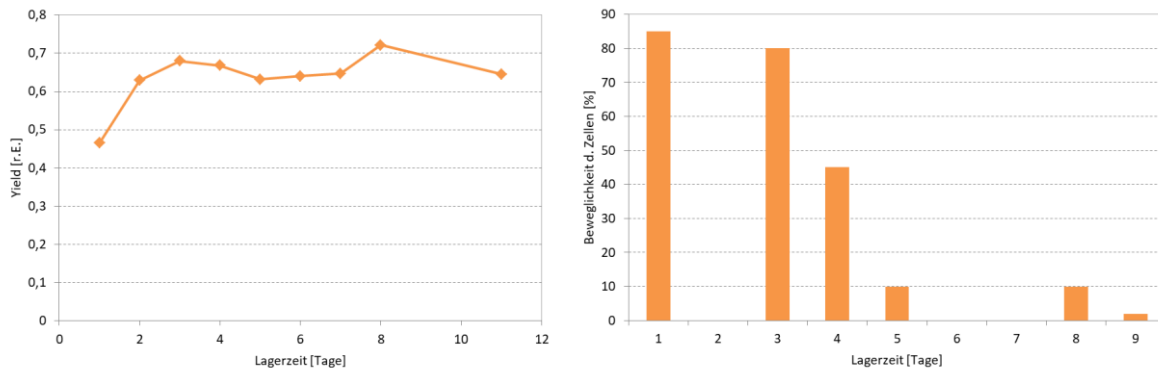


ABB. 38 YIELD UND BEWEGLICHEKEIT VON *ISOCHRYSIS*-KONZENTRAT (AUS CROSSFLOW)

Weitere Experimente zu dieser Thematik zeigten daß es durch die Kreislaufpumpe durch die die Algensuspension über die Membran geführt wird zu einem Druckanstieg und zu Scherkräften kommt die wahrscheinlich für die Schädigung der Zellen verantwortlich sind. Eine Reduktion des Pumpendruckes führte allerdings zu unrealistisch geringen Durchsatzmengen. Eine wirtschaftliche Ernte größerer Algenmengen bei geringem Druck wäre nur durch eine starke Vergrößerung der Membranfläche realisierbar. Dies ließ sich aus Kostengründen im Rahmen dieses Projektes nicht überprüfen.

Gänzlich ohne Schädigung läuft dagegen die Ernte über passive Sedimentation ab. Dabei werden die Algenzellen in einem gekühlten Becken mit 300L Volumen über mehrere Stunden inkubiert. Durch die Kühlung setzten sich auch bewegliche Algenarten ab. Nachdem das überstehende, klare Medium abgesaugt wurde konnte die sedimentierte Algenbiomasse in einem definierten Volumen resuspendiert, in Kanister abgefüllt und den Projektpartnern zur Verfügung gestellt werden. Diese Erntetechnik wurde innerhalb des Projektes für die empfindlichen *Rhodomonas*- und *Isochrysis*zellen angewendet.

Die Funktionen der Gene von *A. panamensis*, die für die PUFA-Biosynthese verantwortlich sind, wurden in Hefen durch Expression der eingefügten kodierenden Region und Wachstum der Hefen in Anwesenheit von potenziellen PUFA-Substraten charakterisiert.

### METHYL-END-DESATURASEN

Als Kontrolle wurde das FA-Profil von Hefen mit dem leeren pYES2-Vektor verwendet. Die Kontrollhefen zeigten vier Peaks bei 16:0, 16:1, 18:0 und 18:1n-9, was typisch für die Hefen *S. cerevisiae* ist (Abb. 39).

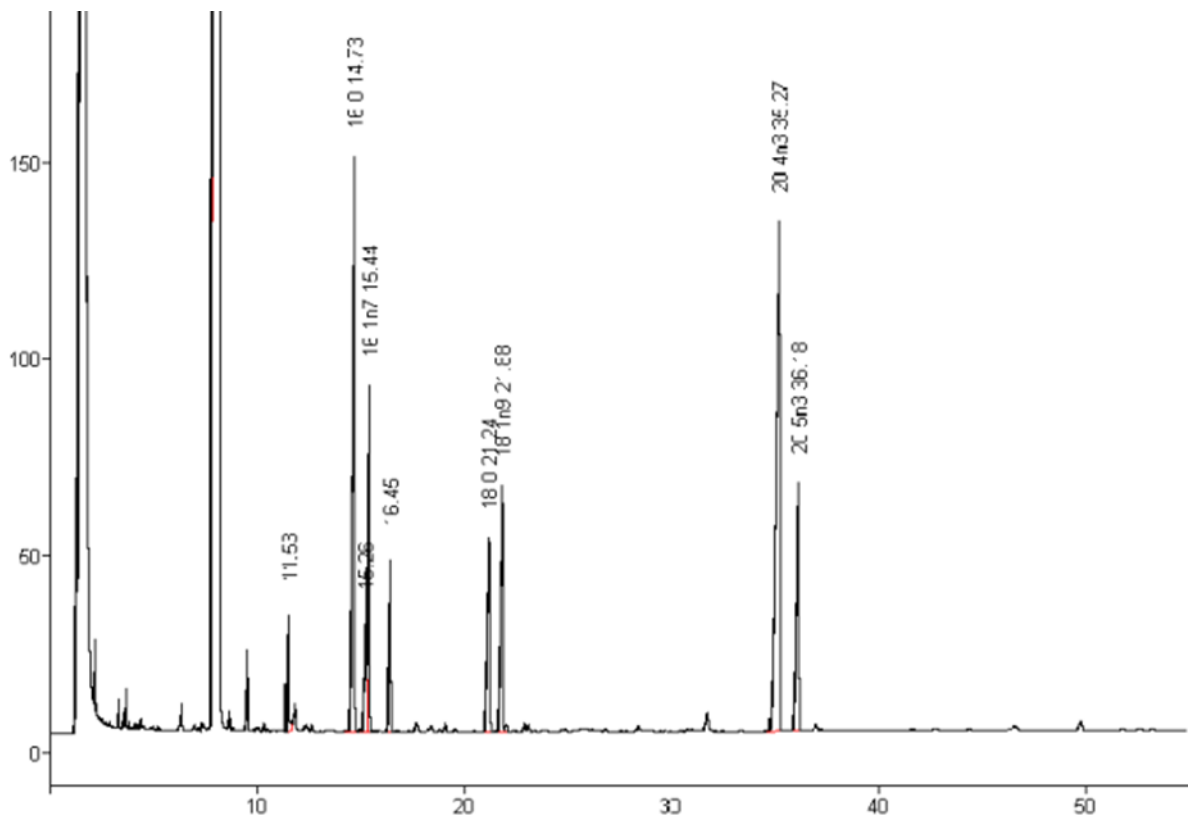


ABB. 39 ENZYMATISCHE AKTIVITÄT DES FED1-GENS VON *APOCYCLOPS PANAMENSIS*, DIE DIE KONVERSION VON 20:4N-3 IN 20:5N-3 VERANSCHAULICHT, DIE EINE  $\omega$ 5-AKTIVITÄT DARSTELLT

Die FA-Profile der transformierten Hefen, die die *A. panamensis*-Desaturasen exprimieren und in Gegenwart von exogen zugesetzten C 18-, C 20- und C 22-n-6-PUFA-Substraten wuchsen, zeigten zusätzliche Peaks, die n-3-Desaturierungsprodukten entsprechen, was bestätigt, dass die  $\omega$ x1- und  $\omega$ x2-Desaturasen von *A. panamensis* eine  $\Delta$ 15-,  $\Delta$ 17- bzw.  $\Delta$ 19-Desaturierungskapazität haben (Tab. 3). Was die prozentuale Umwandlung anbelangt, so zeigte *A. panamensis* eine viel höhere Aktivität der  $\omega$ x-Desaturasen als die bekannten harpacticoiden Copepoden (*T. californicus* und *L. littoralis*), einschließlich der Umwandlung

von ARA in EPA (17,6 % & 24,9 % für  $\omega$ x1 bzw.  $\omega$ x2) und in DHA (1,3 % & 16,6 % für  $\omega$ x1 bzw.  $\omega$ x2). Letzteres ist besonders bemerkenswert, da diese  $\omega$ x2-Desaturase das einzige bisher bekannte Enzym dieses Typs mit einer so hohen Aktivität ist. So wandelten transformierte Hefen, die beide Typen von *A. panamensis*  $\omega$ x-Desaturasen exprimieren, alle angebotenen Substrate in die Produkte um, wobei die  $\Delta$ 15-,  $\Delta$ 17- und  $\Delta$ 19-Aktivität eindeutig nachgewiesen wurde. Die enzymatische Kapazität der  $\omega$ x-Desaturasen ist für die PUFA-Biosynthese am wichtigsten, denn um die Synthese in Gang zu setzen, müssen die Doppelbindungen eingeführt werden, und die Umwandlung von 18:2n-6 in 18:3n-3 muss stattfinden.

TAB. 3 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER *APOCYCLOPS PANAMENSIS*-METHYLEND-DESATURASEN ( $\Omega$ X).

% conversion

FA substrate	Product	$\omega$ x 1	$\omega$ x 2	Activity
18:2n-6	18:3n-3	45.9	44.4	$\Delta$ 15
18:3n-6	18:4n-3	45.4	25.0	$\Delta$ 15
20:2n-6	20:3n-3	4.5	16.0	$\Delta$ 17
20:3n-6	20:4n-3	11.7	24.9	$\Delta$ 17
20:4n-6	20:5n-3	17.6	24.9	$\Delta$ 17
22:4n-6	22:5n-3	2.6	22.3	$\Delta$ 19
22:5n-6	22:6n-3	1.3	16.6	$\Delta$ 19

Diese  $\omega$ x-Desaturasen zeigten auch eine geringe, aber nachweisbare  $\Delta$ 12-Aktivität, die für den ersten Schritt der Umwandlung von Ölsäure in LA wichtig ist. Die weitere Umwandlung von LA in ALA wurde von beiden Enzymen mit hoher Effizienz durchgeführt.

---

### FRONT-END-DESATURASEN

---

Um die Funktionen von FED1 und FED2 aufzudecken, wurden transgene Hefen in Anwesenheit von zugesetzten Desaturase-substraten (18:3n-3, 18:2n-6, 20:3n-3, 20:2n-6, 20:4n-3, 20:3n-6, 22:5n-3 und 22:4n-6) gezüchtet. Tests zur funktionellen Charakterisierung der Fed1-Desaturase zeigten, dass FED1 die Kapazität zur  $\Delta$ 6- und  $\Delta$ 5-Desaturierung

besitzt, da transgene Hefen, die diese kodierenden Regionen exprimieren, in der Lage waren, 18:3n-3 in 18:4n-3, 18:2n-6 in 18:3n-6 ( $\Delta 6$ ) und 20:4n-3 in 20:5n-3, 20:3n-6 in 20:4n-6 ( $\Delta 5$ ) zu konvertieren (Tabelle 2). In Anwesenheit von 20:3n-3-, 20:2n-6-, 22:5n-3- und 22:4n-6-Substraten wurde keine Aktivität beobachtet, was zeigt, dass die FED1-Desaturase von *A. panamensis* keine  $\Delta 8$ - bzw.  $\Delta 4$ -Desaturierungskapazitäten besitzt. FED2 zeigte eine geringe  $\Delta 4$ -Aktivität, aber es wurden keine anderen enzymatischen Kapazitäten in diesem Enzym nachgewiesen. Keine der FEDs zeigte nachweisbare  $\Delta 8$ -Aktivität (Tab. 4).

TAB. 4 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER FRONT-END-DESATURASEN VON *APOCYCLOPS PANAMENSIS* (FED).

% conversion

FA substrate	Product	Fed 1	Fed 2	Activity
18:3n-3	18:4n-3	22.8	n.d.	$\Delta 6$
18:2n-6	18:3n-6	11.5	n.d.	$\Delta 6$
20:3n-3	20:4n-3	n.d.	n.d.	$\Delta 8$
20:2n-6	20:3n-6	n.d.	n.d.	$\Delta 8$
20:4n-3	20:5n-3	24.8	0.9	$\Delta 5$
20:3n-6	20:4n-6	9.9	n.d.*	$\Delta 5$
22:5n-3	22:6n-3	n.d.	0.3	$\Delta 4$
22:4n-6	22:5n-6	n.d.	n.d.*	$\Delta 4$

Es wurden zusätzliche Versuche für FED1 durchgeführt, um seine Fähigkeit zu prüfen, DHA über den Sprecher-Weg zu produzieren. DHA wird bei Tieren auf zwei verschiedene Arten synthetisiert: über den Sprecher-Weg (bei Ratten, einigen Fischen und einigen Mollusken) und über den  $\Delta 4$ -Weg (bei Teleost-Fischen). Beide Wege beinhalten eine Verlängerung von EPA, die durch Elongasen erfolgt. Im Sprecher-Weg findet eine weitere Elongation statt, bei der 24:5n-3 entsteht, das anschließend durch  $\Delta 6$ -Aktivität zu 24:6n-3 entsättigt und dann in DHA umgewandelt werden muss (Abb. 7). Die Aktivität von FED1 gegenüber 24:5n-3 wurde nicht nachgewiesen, so dass *A. panamensis* wahrscheinlich nicht zur DHA-Synthese über den Sprecher-Weg beitragen kann. Die  $\omega 2$ -Desaturase zeigte jedoch eine  $\Delta 19$ -Aktivität, die auf 16,6 % geschätzt wird, und kann somit die endgültige Umwandlung von 22:5n-6 in DHA durchführen. Außerdem wurde in FED2 eine gewisse  $\Delta 4$ -Aktivität festgestellt, die

möglicherweise die Synthese von DHA über den  $\Delta 4$ -Weg ermöglicht. Frühere Desaturasen mit  $\Delta 4$ -Aktivität wurden nur in Mikroalgen und einigen Teleostfischen gefunden. Kabeya et al. (2021) fanden kürzlich jedoch  $\Delta 4$ -FED in *T. californicus*, dem ersten wirbellosen Tier mit einem solchen Enzym. *A. panamensis* zeigte eine eher geringe, aber deutlich nachweisbare  $\Delta 4$ -Aktivität, so dass wir annehmen können, dass zyклоpoide Copepoden potenziell DHA über den  $\Delta 4$ -Weg produzieren können.

---

### FETT-ACYL-ELONGASEN

---

Alle 6 ELO zeigten Aktivität gegenüber zugesetzten Substraten, die zu den n-3- und n-6-Gruppen gehörten. ELO1, ELO3 und ELO4 zeigten eine höhere Gesamtaktivität, während ELO6 eine hohe Aktivität gegenüber allen C18-Substraten, aber nicht gegenüber C20, C22 und C24 zeigte. Die höchsten Gesamtaktivitäten wurden bei ELO1 und ELO3 mit Werten zwischen 0,1 und 95,1 % festgestellt. ELO2 zeichnete sich durch eine niedrige Konversionseffizienz aus, die zwischen 0,4 und 3,4 % lag (Tab. 5), was auch für das gleiche Enzym bei anderen Arten beobachtet wurde (Kabeya et al. 2021).

TAB. 5 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER FRONT-END-DESATURASEN VON *APOCYCLOPS PANAMENSIS* (FED).

FA substrate	Product	Elo 1	Elo 2	Elo 3	Elo 4	Elo 5	Elo 6	Activity
18:3n-3	20:3n-3	27.4	3.4	36.7	26.9	2.5	39.8	C18→ C20
	22:3n-3	4.3	n.d.	n.d.	3.4	n.d.	n.d.	C20→ C22
18:2n-6	20:2n-6	2.4	1.9	3.5	8.4	0.7	10.3	C18→ C20
	22:2n-6	0.1	0.2	n.d.	1.9	n.d.	n.d.	C20→ C22
18:4n-3	20:4n-3	29.1	0.6	63.3	16.2	6.7	20.1	C18→ C20
	22:4n-3	14.2	n.d.	0.6	1.2	n.d.	n.d.	C20→ C22
18:3n-6	20:3n-6	11.7	0.8	48.1	12.0	8.3	10.0	C18→ C20
	22:3n-6	1.5	n.d.	0.4	1.2	n.d.	n.d.	C20→ C22
20:5n-3	22:5n-3	95.1	1.5	15.5	16.3	6.3	n.d.	C20→ C22
	24:5n-3	0.4	n.d.	0.1	0.7	n.d.	n.d.	C22→ C24

20:4n-6	22:4n-6	66.6	1.1	7.0	26.1	3.1	n.d.	C20→ C22
	24:4n-6	n.d.	n.d.	0.1	1.1	n.d.	n.d.	C22→ C24
22:5n-3	24:5n-3	0.2	0.4	0.1	4.3	0.8	n.d.	C22→ C24
	26:5n-3	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	n.d.	n.d.	C24→ C26
22:4n-6	24:4n-6	n.d.	0.6	0.3	1.6	1.2	n.d.	C22→ C24

Abschließend wurden zehn *A. panamensis*-Gene, darunter 2 Methyl-End-, 2 Front-End- und 6 Fattyacyl-Elongasen, erfolgreich isoliert und funktionell charakterisiert. Die Analyse der enzymatischen Aktivität der *A. panamensis*-Gene zeigte, dass dieser Copepode die volle Kapazität zur de novo-Biosynthese von PUFA besitzt. Durch das Vorhandensein und die Funktionalität von  $\omega$ x1- und  $\omega$ x2-Desaturasen ist *A. panamensis* in der Lage, n-6-Substrate in n-3-LC-PUFA zu konvertieren. Das Fehlen oder die Nicht-Funktionalität von  $\omega$ x-Desaturasen limitiert in der Regel die de-novo-PUFA-Biosynthese in Tieren (Kabeya et al.). Die Funktionsuntersuchungen der  $\omega$ x1- und  $\omega$ x2-Desaturasen von *A. panamensis* zeigten, dass dieser Copepode ALA (18:3n-3) produzieren kann, was ein entscheidender Schritt in den PUFA-Biosynthesewegen ist. Fische zum Beispiel können eine trophische Aufwertung vornehmen, indem sie n-3 LC-PUFA aus ALA biosynthetisieren, das eine Vorstufe ist und den Fischen von anderen Organismen der unteren trophischen Ebene zur Verfügung gestellt werden muss (et al.). Der Besitz von  $\omega$ x1- und  $\omega$ x2-Enzymen mit  $\Delta$ 12-,  $\Delta$ 15-,  $\Delta$ 17- und  $\Delta$ 19-Aktivitäten lässt uns  $\omega$ x1 und  $\omega$ x2 von *A. panamensis* als  $\omega$ 3-Desaturasen kategorisieren.  $\omega$ 3-Desaturasen führen die Konversion von n-6-Substraten in n-3-Produkte durch (Abb. 7). Daraus lässt sich schließen, dass *A. panamensis* Vorstufen produzieren kann, die von anderen Organismen wie Fischen zu LC-PUFA weiterverarbeitet werden können, aber auch selbst PUFA biosynthetisieren kann, indem es die Funktionalität von Methyl-End-, Front-End- und Fatty-Acyl-Elongasen verbindet. Insgesamt verfügt *A. panamensis* über die vollständige enzymatische Kapazität, LC-PUFA, einschließlich  $\omega$ 3-PUFA, endogen zu synthetisieren. *A. panamensis* und wahrscheinlich auch andere zyklipoide Copepoden können mit Primärproduzenten von  $\omega$ 3-PUFA assoziiert werden, was sie zu einem wertvollen Nahrungsbestandteil für Fischlarven in Aquakulturen macht.

---

#### ALTERNATIVE FUTTERMITTEL FÜR *APOCYCLOPS PANAMENSIS*

---

Die Suche nach einem Futtermittel für Copepoden, das lebende Mikroalgen zumindest teilweise ersetzen kann, wäre für die Vergrößerung von Copepodenkulturen von Vorteil, da dadurch die Kosten für die Produktion von Mikroalgen als einzige Nahrung für Copepoden gesenkt werden könnten. *A. panamensis* hat in unseren früheren Versuchen gezeigt, dass er

sich von einer Vielzahl von Algen und Bäckerhefen ernähren kann. Unser nächstes Ziel war es daher, herauszufinden, ob es möglich ist, alternatives Futter für die Aufzucht von *A. panamensis* in Innenräumen zu verwenden. Das Experiment zur Ermittlung der potenziellen Eignung alternativer Futtermittel für die Zucht von *A. panamensis* wurde im September-Oktober 2021 durchgeführt. Ziel war es, die Auswirkungen verschiedener alternativer Futtermittel auf das Wachstum und die Fettsäurezusammensetzung der Population des zyklopoiden Copepoden *A. panamensis* zu untersuchen. Maisstärke (Abb. 40), Tetra-Konzentrat, Bäckerhefe (Abb. 41) und Tetra-Konzentrat-Maisstärke-Mix (später als Mix bezeichnet) wurden als alternative Futtermittel für die Copepoden ausgewählt, während die lebende Mikroalge *Isochrysis galbana* als Kontrollfutter verwendet wurde. Der Versuch wurde 16 Tage lang durchgeführt.

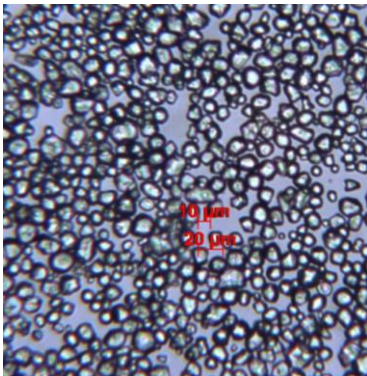


ABB. 40 MIKROFOTOS VON ALTERNATIVEN ERNÄHRUNGSFORMEN FÜR *APOCYCLOPS PANAMENSIS*: MAISSTÄRKE

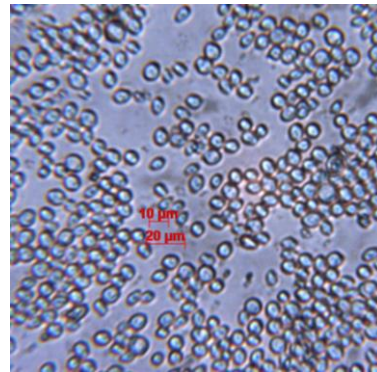


ABB. 41 MIKROFOTOS VON ALTERNATIVEN FUTTERMITTELN FÜR *APOCYCLOPS PANAMENSIS*: BÄCKERHEFEN

Vor Beginn des Versuchs wurden zwanzig 3L-Becken über Nacht mit einer Bleichlösung (20 ml 13 % Natriumhypochlorid pro Becken) gereinigt und desinfiziert. Anschließend wurden die Becken gespült und mit steril gefiltertem künstlichem Meerwasser (34,8 PSU, Red Sea Salt) unter Verwendung eines PALL AcroPak mit 08/02µm Supor Membrane gefüllt. Alle Becken waren mit Licht und Belüftung durch steril gefilterte Luft (Spritzenfilter in jeder Luftleitung) ausgestattet. Die Becken wurden mit weiß-blauen LED-Balken in einem 12:12h Dunkel-Licht-Zyklus beleuchtet.

Jedes Becken wurde mit ca. 1250 Copepoden (ca. 0,5 Ind./ml) aus einem 150L Haltetank im ZMT bestückt. Der Hälterungstank hatte eine Gesamtdichte von 1,87 Ind./ml, bestehend aus 1,12 Copepoditen und 0,78 Nauplien pro ml. Um die 3L-Behälter mit der gewünschten Copepodendichte zu füllen, wurden 670 ml der 150L-Stammkultur mit einem 55µm-Sieb gefiltert und mit FSW in ein Becherglas zurückgespült, bevor die Copepoden in einen der 3L-



Behälter überführt wurden.

Die Copepoden wurden mit fünf verschiedenen Futtermitteln gefüttert. Für jede Futterbehandlung wurden 4 Becken zugeteilt. Die Mengen der einzelnen Futtermittel wurden wie folgt zugegeben:

1. *Isochrysis galbana* (*I. galbana*) wurde in einer Konzentration von 100.000 Zellen/ml verabreicht; die Futtermenge variierte je nach Kulturdichte (z. B. heute 52 ml pro Tank).
2. Konzentrat von *Tetraselmis chuii* (0,42 ml Konzentrat ( $8,35 \times 10^7$  Zellen/ml)) wurde den Becken mit Copepoden zugesetzt, um eine Konzentration von ca. 14.000 Zellen/ml zu erreichen.
3. Frische Bäckerhefe wurde in Form von 0,1 g Hefe aus einer Lösung von 10 ml FSW und 0,5 g Hefe zugegeben (2 ml Lösung pro Tank).
4. Zugabe von 0,1 g Maisstärke aus einer Lösung von 10 ml FSW und 0,5 g Maisstärke (2 ml Lösung pro Tank)
5. *Tetraselmis*-Konzentrat - Maisstärke-Mix wurde als 0,05 g Maisstärke (1ml Stärkelösung) + 0,21ml Tetra-Konzentrat pro Tank zugegeben.

Proben von Copepoden für die Analyse von Fettsäuren (FS) und Aminosäuren (AS) sowie zur Bestimmung der Kulturdichte wurden zu Beginn, während und am Ende des Versuchs entnommen. Die Proben für die FS- und AS-Analyse wurden in dreifacher Ausführung entnommen. Die ersten Proben von *Apocyclops* aus dem Lagertank wurden mit einem 25mm GF/F Whatman-Filter und einer Vakuumpumpe entnommen. Für jede der sechs Proben (3 für FS und 3 für AS) wurden 200 ml der Copepodenkultur durch einen 55-Mikron-Filter geleitet und mit Milli-Q gespült, bevor sie auf einen GF/F-Filter übertragen wurden. Anschließend wurden die Filter kurz mit Milli-Q gespült, um überschüssiges Salz zu entfernen.

Die Diätproben wurden ebenfalls auf GF/F-Filter filtriert oder für die ersten Messungen direkt bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für Proben von *I. galbana* lebenden Algen wurden ca. 12 ml der Kultur durch GF/F-Filter filtriert und mit 10 ml Milli-Q gespült, um überschüssiges Salz zu entfernen.

Für Proben des *T. chuii*-Konzentrats wurde 1 ml des Konzentrats mit 80 ml gefiltertem Meerwasser verdünnt. Von dieser Lösung wurden 10 ml durch GF/F-Filter filtriert. Erneut wurden 10 ml Milli-Q verwendet, um überschüssiges Salz zu entfernen. Zwei 2 ml des Konzentrats wurden zusätzlich in flüssiger Form in Eppendorf-Röhrchen eingefroren.

Maisstärke und Hefe wurden in der Form, in der sie gewonnen wurden, in Eppendorf-Röhrchen eingefroren. Zwei BlankGF/F-Filterproben wurden nach der gleichen Methode wie bei den Copepoden und den Diäten genommen, allerdings nur mit Milli-Q. Alle Proben wurden direkt nach der Entnahme auf Eis gelegt und so schnell wie möglich bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Dichte der *Apocyclops*-Kultur unterschied sich am Ende des Versuchs signifikant zwischen den Behandlungen. Die anfängliche Besatzdichte in den Becken betrug etwa  $0,5 \text{ Ind. ml}^{-1}$ . Das höchste Wachstum wurde vorhersehbar bei Copepoden beobachtet, die mit *Isochrysis* gefüttert wurden, wobei die Dichte am Ende des Versuchs  $7,8 \pm 0,4 \text{ ind. ml}^{-1}$  erreichte, gefolgt von *Tetraselmis*-Konzentrat ( $4,4 \pm 0,4 \text{ ind. ml}^{-1}$ ), Hefen und Tetra-Konzentrat-Maisstärke-Mix ( $2 \pm 0,2 \text{ ind. ml}^{-1}$ ) und Maisstärke ( $0,2 \pm 0,06 \text{ ind. ml}^{-1}$ ) (Abb. 42). Maisstärke als Futter erwies sich nicht als geeignet für *Apocyclops*, die Copepodenkultur reduzierte ihre Dichte nach 16 Versuchstagen.

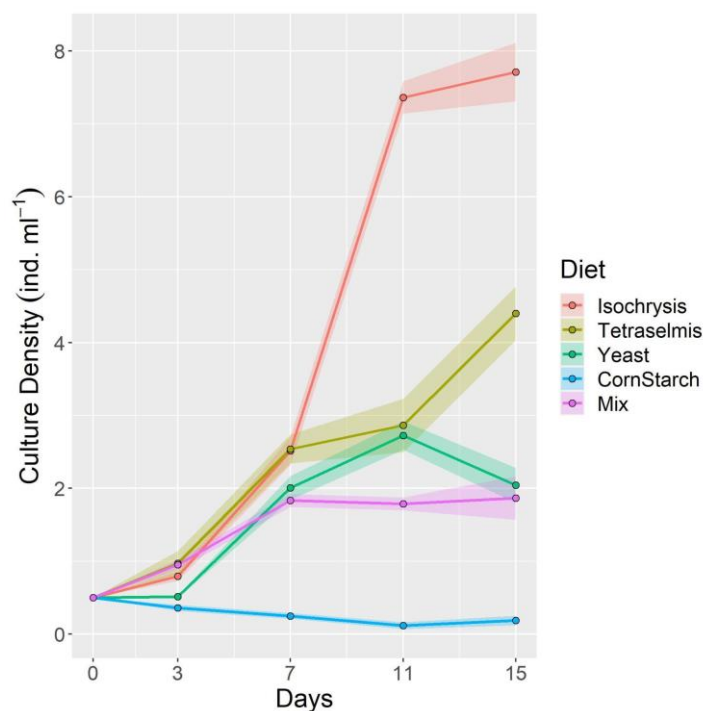


Abb. 42 Dichte der *Apocyclops panamensis*-Kultur bei Fütterung mit verschiedenen Futtermitteln.

Die Zusammensetzung der Lebensstadien der *Apocyclops*-Kulturen ist in Abb. 43 und Abb. 44 dargestellt. Während des gesamten Versuchs wurden die mit *Isochrysis*, Tetra-Konzentrat, Hefen und Mix gefütterten Kulturen von Nauplien dominiert, mit Ausnahme der mit *Isochrysis* gefütterten *Apocyclops*-Kulturen, bei denen am Ende

des Versuchs (Tag 15) Copepoditen häufiger vorkamen als Nauplien. Die Zunahme des Nauplienanteils über einen Zeitraum von 7 Tagen, der durchschnittlichen Generationszeit von *A. panamensis*, deutet auf eine kontinuierliche Reproduktion während des Versuchs hin. Eine Zunahme der Anzahl der Nauplien von Tag 0 bis Tag 7 wurde bei allen Behandlungen beobachtet, außer bei Maisstärke. Während der Anstieg der Naupliendichte bei allen vier Behandlungen zu beobachten war, nahm die Anzahl der Copepoden bei den Behandlungen mit *Isochrysis*, *Tetraselmis*-Konzentrat und Mix zu, während sie bei den Behandlungen mit Hefe und Maisstärke abnahm, was auf eine hohe Mortalität der Copepoden bei ausschließlicher Fütterung mit Nicht-Algen-Futter hinweist.

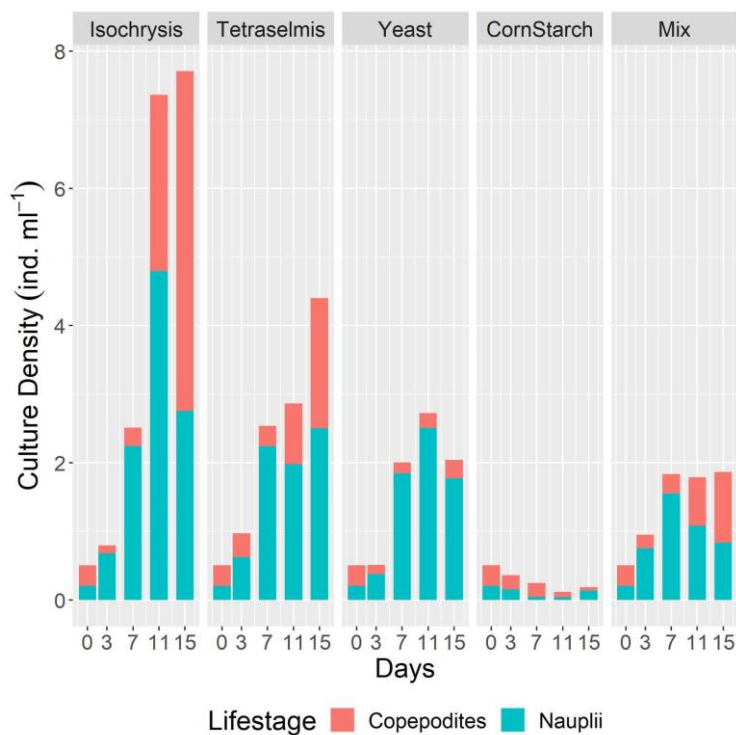


ABB. 43 DICHTE UND LEBENSSTADIENZUSAMMENSETZUNG VON *APOCYCLOPS PANAMENSIS*-KULTUREN, DIE MIT VERSCHIEDENEN FUTTERMITTELN GEFÜTTERT WURDEN.

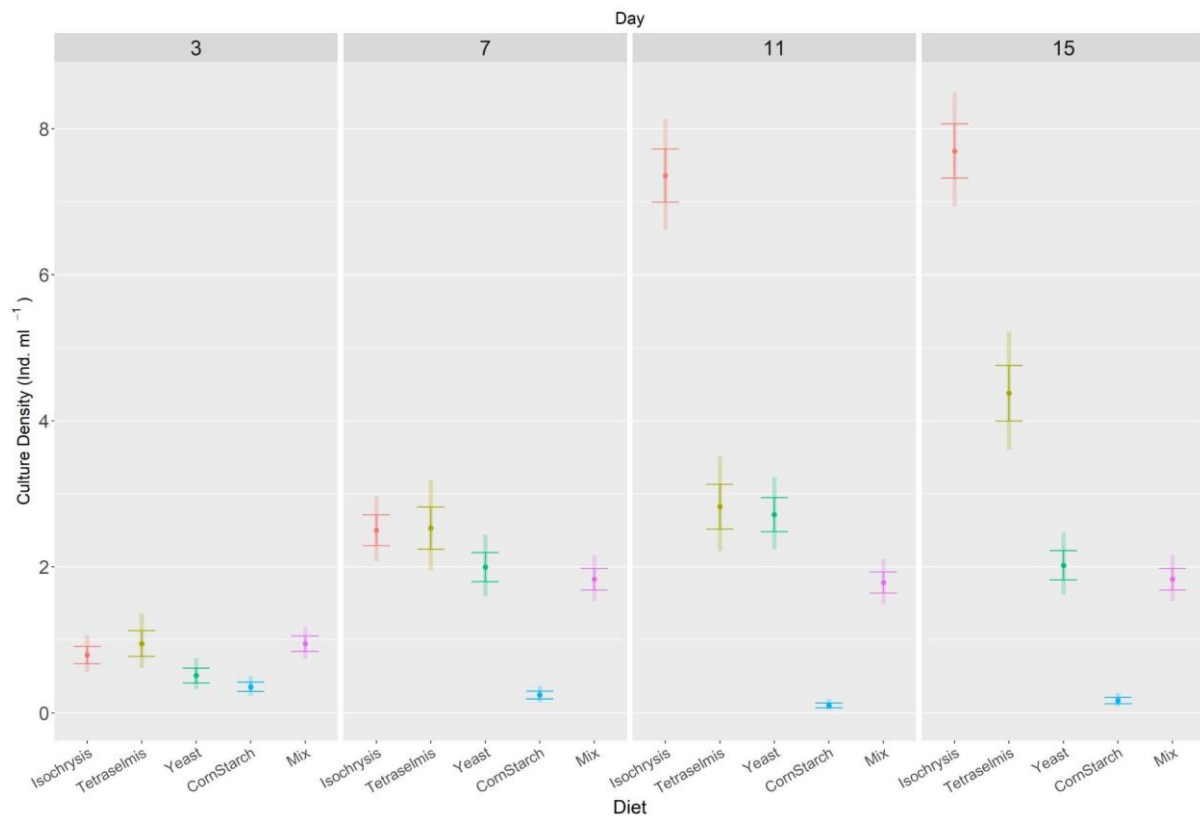


ABB. 44 DICHTEN DER MIT VERSCHIEDENEN FUTTERMITTELN GEFÜTTERTEN *APOCYCLOPS PANAMENSIS*-KULTUREN, DARGESTELLT DURCH MITTELWERTE

Der Grundgehalt und die Zusammensetzung der Aminosäuren (AS) von *A. panamensis* aus der Stammkultur wurden ebenso untersucht wie die Fluktuationen der biochemischen AS- und FA-Profile während des Versuchs. Insgesamt waren neun essentielle Aminosäuren (EAS), darunter Threonin, Valin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Histidin, Lysin, Arginin und Tyrosin, und acht nicht-essentielle Aminosäuren (NEAS), darunter Cystein (CYS), Taurin (TAU), Asparagin (ASP), Serin (SER), Glutamin (GLU), Alanin (ALA) und Ornithin (ORN) vorhanden (Abb. 45).

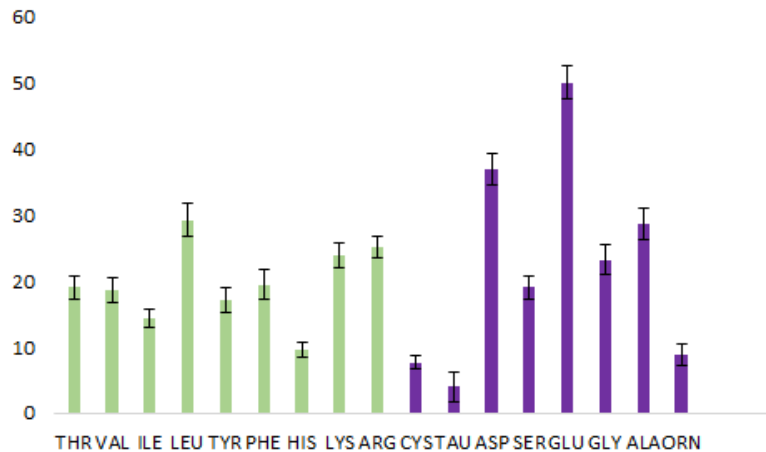


ABB. 45 AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG VON *APOCYCLOPS PANAMENSIS*,. GRÜN = ESSENTIELLE AMINOSÄUREN (EAA) BLAU= NICHT-ESSENTIELLE AMINOSÄUREN (NEAA)

Am Ende des Versuchs wurden von allen Copepoden Proben für die FS- und AS-Analyse entnommen, und zwar zwei Proben pro Becken für die nachfolgenden Wiederholungen. Diese Proben werden verwendet, um die Auswirkungen der Diäten auf die Ernährungsqualität von *Apocyclops* und ihre FS- und AS-Profile zu bewerten.

---

#### FETTSÄUREPROFILE VON *APOCYCLOPS PANAMENSIS*

---

Die Fettsäurezusammensetzung von *A. panamensis*, die mit verschiedenen Futtermitteln gefüttert wurde, variierte signifikant. Der höchste Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) wurde bei Copepoden beobachtet, die mit *I. galbana* und *Tetraselmis chuii* Konzentrat gefüttert wurden (22,15 % bzw. 22,04 %) (Tab. 6). *Apocyclops*, die mit Tetra-Konzentrat gefüttert wurden, wiesen im Vergleich zu Copepoden, die mit anderen Futtermitteln gefüttert wurden, den niedrigsten Anteil an gesättigten Fettsäuren (SFA, 42,86 %) und das niedrigste Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren (SFA/UFA, 0,75) auf.

TAB. 6 FETTSÄUREZUSAMMENSETZUNG VON *APOCYCLOPS PANAMENSIS* UND SEINER DIÄT. DER FETTSÄUREGEGHALT WIRD ALS ANTEIL DER GEMESSENEN FETTSÄUREN DARGESTELLT. SFA: GESÄTTIGTE FETTSÄUREN; MUFA: EINFACH UNGESÄTTIGTE FETTSÄUREN; PUFA: MEHRFACH UNGESÄTTIGTE FETTSÄUREN.

Fatty acid	Fatty acid content								
	Isochrysis	Copepods (Isochrysis)	Tetraselmis	Copepods (Tetraselmis)	Yeast	Copepods (Yeast)	CornStarch	Copepods (CornStarch)	Copepods (Mix)
<b>PUFA</b>									
C22:6 (DHA)	1.05	5.42		1.17					0.92
C20:5 (EPA)		0.9	1.49	1.97					1.28
C20:4 (ARA)				0.52					0.38
C20:3 (ALA)				0.23					0.08
C18:4	3.23	4.84		0.54					1.34
C18:3	1.94	6.11	6.30	8.54			2.94		5.02
C18:2	7.12	4.88	10.38	5.68	16.67	5.90	28.51	5.87	3.47
C16:4			3.02	3.39			0.54		4.01
<b>MUFA</b>									
C20:1				0.48					0.73
C18:1n11t	1.96	4.83	0.95	3.43	1.83	0.28	2.29	0.26	2.82
C18:1n9c	29.63	13.37	34.97	27.8	16.66	16.36	32.52	21.07	30.65
C16:1	2.39	4.03	5.96	3.39	5.13	0.36	2.32	0.71	5.29
<b>SFA</b>									
C24					1.35				
C22			0.45		2.08				
C20	0.62				1.46		0.40		0.63
C18	16.29	12.36	12.07	14.03	21.35	28.35	6.47	26.92	12.97
C16	28.45	29.97	21.93	26.12	32.81	46.01	21.92	44.16	29.20
C14	7.58	13.28	2.62	2.71	0.68	2.75	2.13	1.01	1.67
ΣPUFA	13.35	22.15	21.20	22.04	16.67	5.90	31.98	5.87	16.49
ΣMUFA	33.98	22.23	41.88	35.10	23.62	22.04	37.13	22.04	39.49
ΣSFA	52.94	55.61	37.07	42.86	59.71	72.09	30.91	72.09	44.47
SFA/UFA	1.12	1.25	0.59	0.75	1.48	2.58	0.45	2.58	0.79

So wie *A. panamensis*, der mit mikroalgenhaltigem Futter gefüttert wurde, einen höheren Gehalt an PUFA, MUFA, einschließlich der für die Ernährung von Fischlarven wichtigen DHA, EPA und ARA auf, während die Fettsäureprofile von Copepoden, die mit Hefe und Maisstärke gefüttert wurden, durch einen hohen Anteil an SFA gekennzeichnet waren. Es zeigte sich, dass *Tetraselmis* aufgrund des hohen Anteils an UFA, des geringen Anteils an SFA und des Vorhandenseins von Vorläufern für die Biosynthese hoch ungesättigter Fettsäuren eine bessere Ernährung für *A. panamensis* darstellt. Die Verwendung von *Tetraselmis*-Konzentrat für die Aufzucht von *Apocyclops*-Kulturen ermöglicht es, die hohen Kosten für die Pflege lebender Algen wie z.B. *Isochrysis* zu reduzieren. Die Möglichkeit, *Tetraselmis*-Konzentrat mit anderen alternativen Futtermitteln zu kombinieren, ist ebenfalls ein Vorteil für den Einsatz in der *Apocyclops*-Kultur. Wahrscheinlich wird die Kombination von *Tetraselmis*-Konzentrat mit Hefen bessere Ergebnisse liefern als die Kombination mit Maisstärke, da in unserem Experiment gezeigt wurde, dass die *Apocyclops*-Kulturen auf

Maisstärke-Diät nicht wachsen, aber sie vermehren sich, wenn sie nur mit Hefen gefüttert werden.

---

## FÜTTERUNGSVERSUCH MIT DORADEN-FISCHLARVEN IN DER GMA

---

Anfang 2022 wurde das große gemeinsame Experiment aller drei Partner mit Fischlarven in den Anlagen der GMA gestartet. Die Einzelheiten des Versuchs mit Fischlarven werden auch vom Projektpartner GMA selbst beschrieben. In diesem Experiment wurde *A. panamensis* in einer der Diätbehandlungen als "Nahrungspille" verwendet, als Zusatz zur Nahrung der Doradenlarven.

Kurz gesagt wurden die Doradenlarven nach dem Zufallsprinzip in verschiedene Becken mit 6 verschiedenen Futterbehandlungen eingeteilt (Behandlung Nr. 6 war eine Extrabehandlung, ein Ersatz für Behandlung Nr. 5): 1. Artemia-Kontrolldiät, 2. Mikrodiät (MD) mit gemeinsamer Fütterung von Rädertieren und Artemia, 3. MD mit gemeinsamer Fütterung von Rädertieren, 4. MD mit gemeinsamer Fütterung von *Acartia tonsa* (*A. tonsa*), 5. *A. panamensis* bis zum 15. *A. tonsa* bis zum 15. Tag plus *A. panamensis*.

Bei der Behandlung 5 wurde *A. panamensis* durch ein 200- $\mu$ m-Sieb gefiltert und ab Tag 4 an die Fischlarven verfüttert (Abb. 47 und Abb. 48). Diese Behandlung wurde abgebrochen, da die Größe des *A. panamensis*-Futters, das sowohl Nauplien als auch adulte Copepoden enthielt, für die Larven zu groß zu sein schien, einige Larven an den Copepoden erstickten und eine hohe Mortalität bei den Doradenlarven beobachtet wurde.

Behandlung Nr. 6 war die Alternative zur Behandlung mit *A. panamensis*. Nach 11 Tagen wurde die Fütterung mit *A. tonsa* langsam reduziert und die Fütterung mit *Apocyclops* langsam gesteigert, bis die Tiere nach 20 Tagen auf Trockenfutter umgestellt wurden und bis zum Ende des Versuchs (Tag 60) mit MD gefüttert wurden. *A. panamensis* wurde zu Beginn durch ein 100- $\mu$ m-Sieb und am Ende der Behandlung durch ein 200- $\mu$ m-Sieb gefiltert. Diese Behandlung zeigte positive Ergebnisse: Die Larven erreichten eine Größe, die groß genug war, um sich von *A. panamensis* zu ernähren, und profitierten von der erhöhten Biomasse des FutterS. Außerdem trug *A. panamensis* zur Aufrechterhaltung einer sauberen Umgebung in den Larvenbecken bei, da *A. panamensis* die Beckenwände und den Überschuss an Trockenfutter abweidete.

Um genügend *A. panamensis* für die Fischlarven zur Verfügung zu haben, wurde die Kultur von *A. panamensis* vergrößert, und schließlich wurden Copepoden in sechs 200-Liter-Glasfasertanks mit konischem Boden (jeder Tank war zu ca. 150 Litern gefüllt, Tanks 1-6), zwei 2000-Liter-Kunststofftanks (jeder Tank war zu ca. 1500 Litern gefüllt, Tanks X und Y)

und einem aufgeschnittenen 1000-Liter-IBC-Container (Z), der zu ca. 600 Litern gefüllt war, gezüchtet (Abb. 46). Alle Kulturen wurden bei ca. 25,5 (+- 1) °C gehalten. Der Salzgehalt richtete sich nach dem aktuellen Salzgehalt in der Nordsee und lag zwischen 23 und 30 PSU.

Die *Apocyclops*-Kulturen wurden überwiegend mit *T. chuii*-Konzentrat von BBT gefüttert.

Das erforderliche Konzentratvolumen wurde auf der Grundlage der gewünschten Kulturdichte (12 Ind./ml) und der Konzentratdichte (in der Regel etwa  $9e+07$  Zellen/ml) nach folgender Formel berechnet:

$$(((\text{Wasser\_Volumen} * 1000) * 14000 / \text{Algen\_Dichte}) * (\text{Copepoden\_Dichte} / 4))$$
. Das *Tetraselmis*-Konzentrat erwies sich als einfacher zu handhaben als lebende Mikroalgen und war ausreichend, um hohe Vermehrungsraten von *A. panamensis* zu ermöglichen. Wenn die Kulturdichte deutlich unter 12 Ind./ml lag, wurde die erforderliche Futtermenge durch die Wahl einer niedrigeren gewünschten Kulturdichte (z.B. 10 Ind./ml) verringert, um *Apocyclops* nicht zu überfüttern.

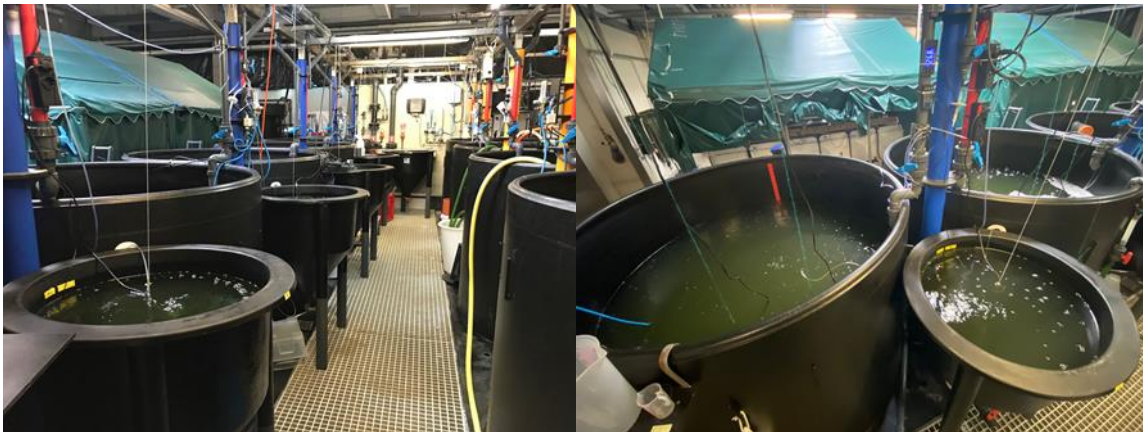


ABB. 46 BECKEN MIT *APOCYCLOPS PANAMENSIS*-KULTUREN IN GMA-EINRICHTUNGEN



ABB. 47 FILTERN DER COPEPODEN VOR DER FÜTTERUNG DER FISCHLARVEN





ABB. 48 FISCHLARVEN, DIE SICH VON *APOCYCLOPS PANAMENSIS* ERNÄHREN

*Isochrysis* wurde als Zusatz gegeben (z. B. 10 % des erforderlichen Futters). Das benötigte Futter wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$(((\text{Wasservolumen} \cdot 1000) \cdot 100000 / \text{Algen\_Dichte}) \cdot (\text{Copepoden\_Dichte} / 7))'$$

*Apocyclops* wurden täglich geerntet, um eine Dichte von 15-40 Ind. ml<sup>-1</sup> (15 Ind. ml<sup>-1</sup> zu Beginn und am Ende des Versuchs, 40 Ind. ml<sup>-1</sup> an den Tagen 8-13) in den Fischbecken zu erreichen. Diese Dichte erwies sich als ausreichend für die Anzahl der Larven in den Becken. So wurden pro Tag zwischen 5,5 und 11,5 Mio. Ind. von *A. panamensis* geerntet.

Während des gesamten Versuchszeitraums wurde die Kulturdichte von *A. panamensis* überwacht. Die Schwankungen der *Apocyclops*-Dichte in den verschiedenen Zuchtbecken sind in Abb. 49 dargestellt.

Die *Apocyclops*-Kulturen in den kleineren Becken (Becken 1-6, 150 l Kultur) wurden während der gesamten zweimonatigen Versuchsdauer kultiviert, und es wurden eindeutige Zyklen von Kulturwachstum und -rückgang beobachtet. Die maximale Dichte von *A. panamensis* erreichte 40 Ind./ml, das war die höchste uns bisher bekannte Dichte einer Copepodenkultur. Die durchschnittliche Dichte der *Apocyclops*-Kultur schwankte zwischen 10 und 20 Ind./ml, was ebenfalls auf eine erfolgreiche Etablierung der Kultur in den Becken hinweist. Früher lag die Dichte der Copepodenkultur in Innenräumen bei 3-5 Ind./ml. Die Dichte von 10-20 Ind./ml reicht nicht aus, um eine ausschließliche Ernährung für Fischlarven zu gewährleisten, aber sie erwies sich als ausreichend, um als "Nahrungsergänzung" für Larven in ihren frühen Lebensstadien verwendet zu werden.

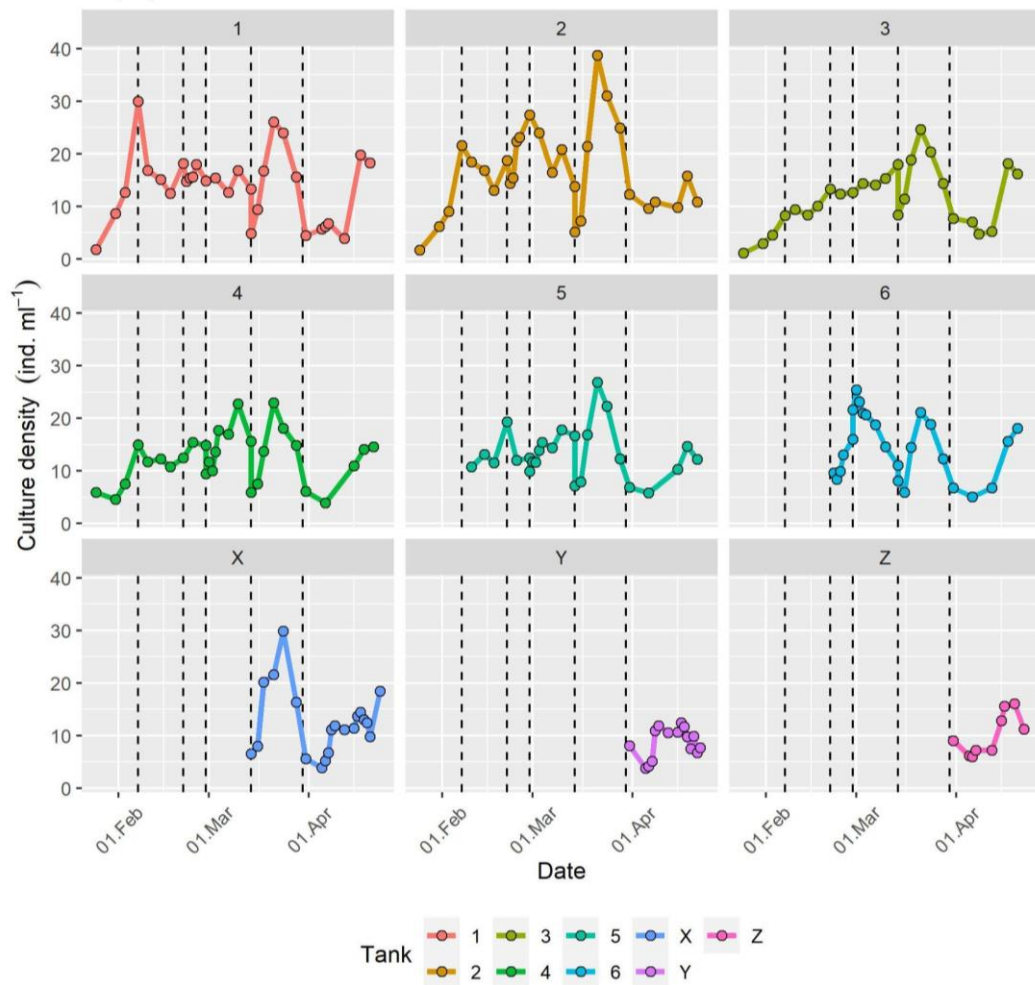


ABB. 49 DYNAMIK DER DICHTEN VON *APOCYCLOPS PANAMENSIS* IN ZUCHTBECKEN WÄHREND EINES FISCHLARVENVERSUCHS

Neben dem Experiment mit den großen Fischlarven wurden auch Miniversuche zum Ernten durchgeführt. Bei diesen Experimenten wurde *Apocyclops* in 200L-Tanks (150L Kultur) gehalten.

#### EXPERIMENT ZUR ENTNAHME VON NAUPLIEN

*A. panamensis*-Nauplien wurden aus zwei Becken geerntet und in ein leeres Becken überführt. Aus jedem der beiden Becken wurden 50 % der Kultur mit einem 100- $\mu$ m- und einem 38- $\mu$ m-Sieb geerntet. Die Copepoditen auf dem 100- $\mu$ m-Sieb wurden in die Kultur zurückgespült, und die Copepoditen auf dem 38- $\mu$ m-Sieb wurden in den leeren Tank (Tank 6) überführt. Die Dichtedynamik wurde 4 Tage lang (22.02.-25.02. in den Diagrammen) nach der Ernte täglich beobachtet, um die Reaktion der Kulturen zu beobachten (Abb. 50).

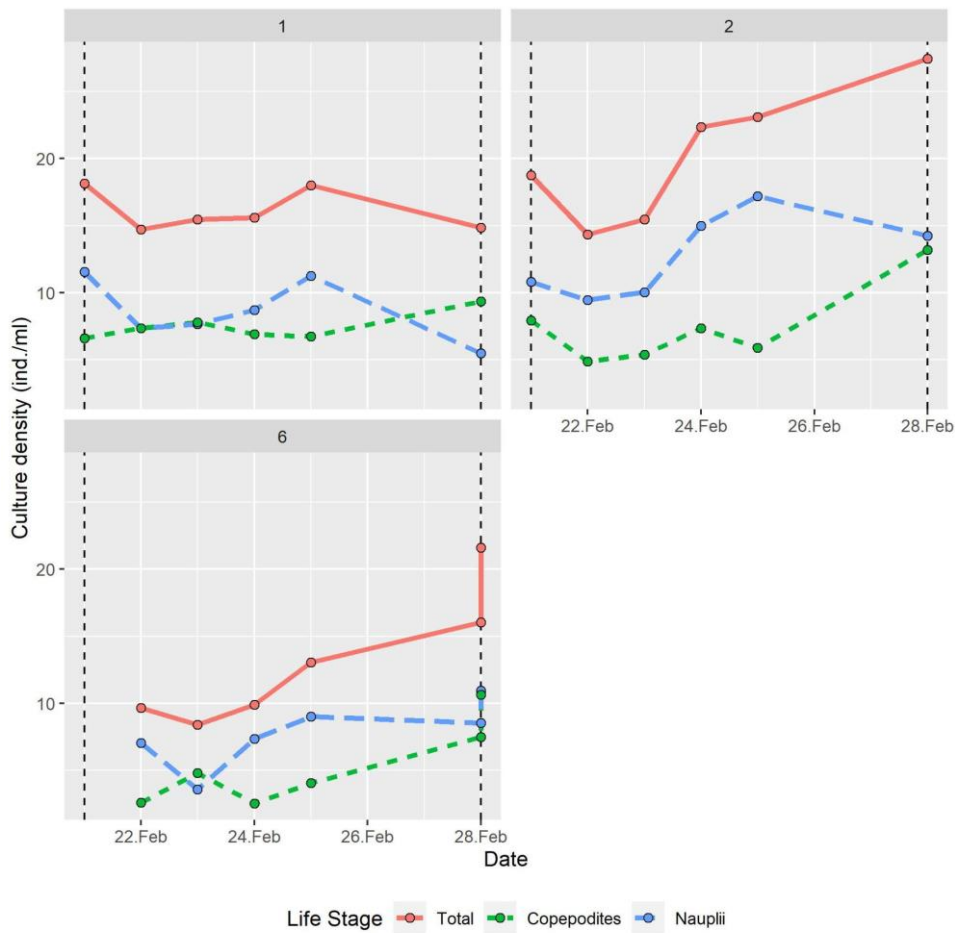


Abb. 50 Dichtedynamik von *Apocyclops panamensis*-Kulturen nach der Nauplienentnahme in den Becken

Die Beseitigung großer Kohorten von Nauplien in den Becken 1 und 2 führte zu einem allmählichen Anstieg der gesamten *Apocyclops*-Dichte und der Nauplien-Dichte am Ende der 4-tägigen Beobachtung, während die Copepoditen-Dynamik in vielen Zeitintervallen die der Nauplien widerspiegelte (Anstieg der Nauplien-Zahl ging mit einem Rückgang der Copepoditen-Zahl einher), was auf die Metamorphose der Nauplien zurückzuführen war. Insgesamt führte die Ernte der Nauplien zu einer Erhöhung der Gesamtdichte der Kultur im Laufe der Zeit (6 Tage), was sich positiv auf die Leistung der Kultur und die Reproduktionsrate der Copepoden auswirkte.

#### EXPERIMENT ZUR ENTNAHME VON COPEPODITEN

Die Copepoditen von *A. panamensis* wurden aus zwei Becken geerntet und in ein anderes Becken überführt. Aus jedem der beiden Becken wurden 50 % der Kultur mit einem 100- $\mu\text{m}$ - und einem 38- $\mu\text{m}$ -Sieb geerntet. Die Nauplien auf dem 38- $\mu\text{m}$ -Sieb wurden in die Kultur zurückgespült, und die Copepoditen auf dem 100- $\mu\text{m}$ -Sieb wurden in das leere Becken

(Becken 6) überführt. Die Dichtedynamik wurde 4 Tage lang (01.03. - 04.03.) nach der Entnahme täglich beobachtet, um die Reaktion der Kulturen zu beobachten (Abb. 51).

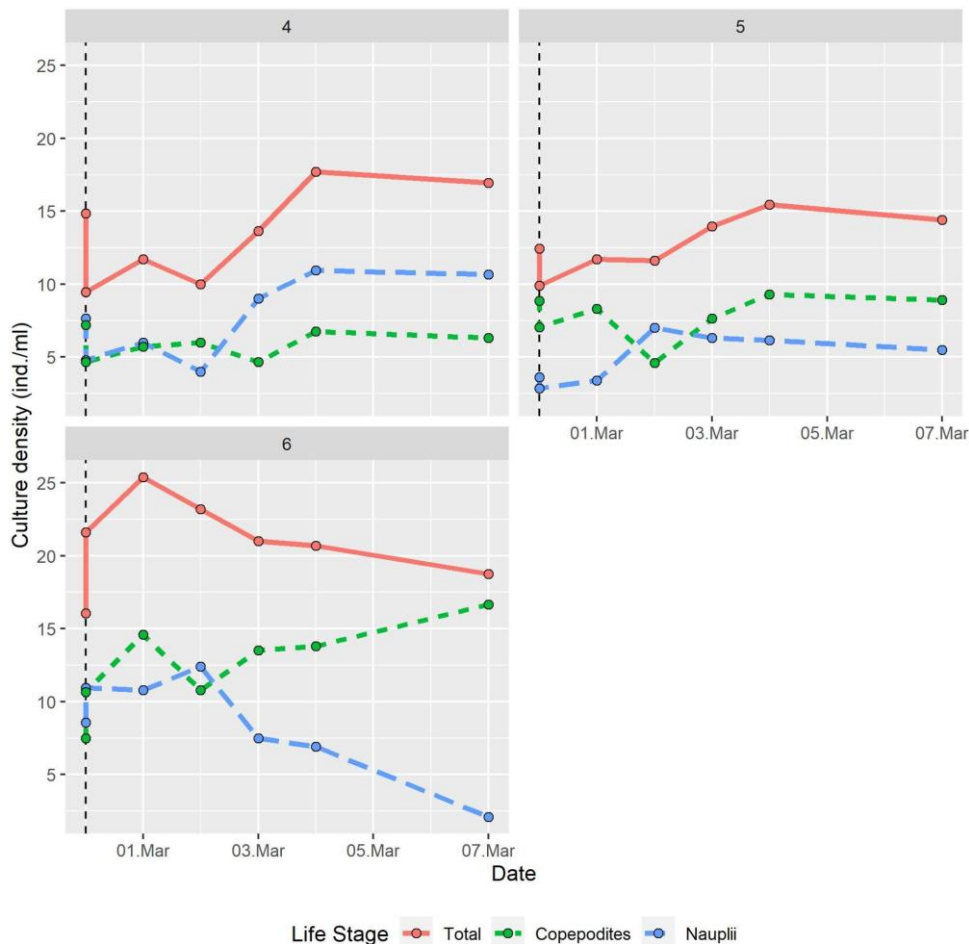


Abb. 51 Dichtedynamik der *Apocyclops panamensis*-Kulturen nach der Entnahme von Copepoditen in den Lagertanks 4, 5 und 6.

Nach der Entnahme der Copepoditen erreichten die *Apocyclops*-Kulturen in den Tanks über mehrere Tage hinweg ihre anfängliche Dichte, wobei kein signifikanter Anstieg der Gesamtdichte der Kultur zu beobachten war. Der Rückgang der Copepoditendichte, der in den Diagrammen dargestellt ist, ging mit dem Anstieg der Naupliendichte einher.

Entnahme von 1,5 Mio. Individuen pro Becken

In diesem Mini-Experiment wurden Copepoditen aus allen 150-Liter-Tanks geerntet und in einen 1200-Liter-Tank (Tank X) überführt. Zum Filtern der Nauplien wurde ein Netz von 38µm verwendet.

Die anschließende Entwicklung der Kulturen in allen Tanks wurde alle 7 Tage nach der Entnahme beobachtet, um festzustellen, ob die Kulturen in der Lage waren, ihre ursprüngliche Dichte wieder zu erreichen.

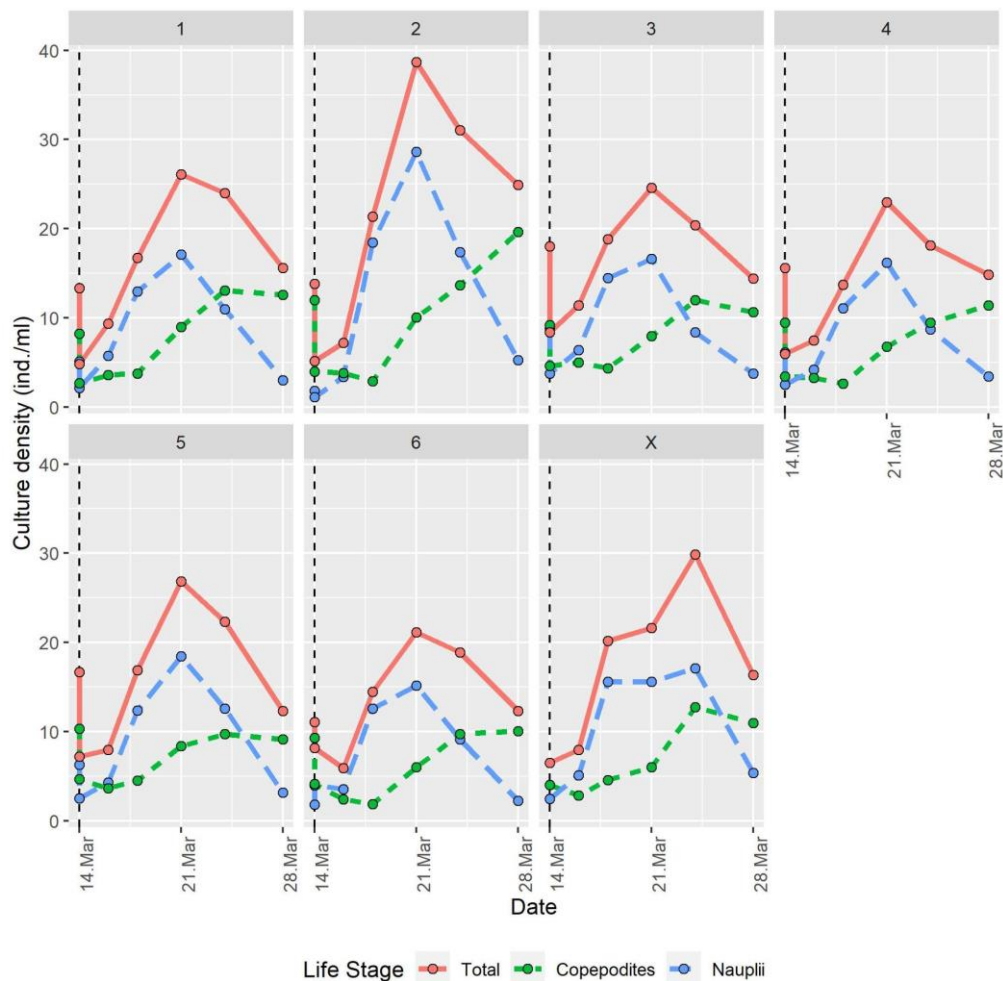


ABB. 52 DICHTEN DER *APOCYCLOPS PANAMENSIS*-KULTUREN NACH DER ENTNAHME VON 1,5 MIO. INDIVIDUEN IN VERSCHIEDENEN BECKEN (1-6 ENTSPRECHEN 150 L DER *APOCYCLOPS*-KULTUR, X ENTSPRICHT 1500 L DER KULTUR).

Die Entnahme von 1,5 Mio. *Apocyclops*-Individuen aus den Kulturen führte zu einem deutlichen Anstieg der Kulturdichte, die nach einer Woche ihren Höhepunkt erreichte, gefolgt von einem deutlichen Rückgang der Dichte nach einer weiteren Woche (Abb. 52). In fünf Becken erreichte die endgültige Dichte ihre Ausgangsdichte (Becken 1, 3-6), während in den beiden anderen Becken (Becken 2 und X) eine deutlich höhere Gesamtdichte an Copepoden festgestellt wurde. Somit ist die Ernte einer großen Kohorte von Copepoden für die Gesamtleistung der Kultur von Vorteil. Durch die regelmäßige Entnahme von Copepoden können *Apocyclops*-Kulturen über längere Zeiträume erhalten werden.

Um den Nährwert des Futters und die Auswirkungen von *A. panamensis* auf die biochemische Zusammensetzung der Fischlarven zu bewerten, wurden Proben des Futters und der Fischlarven für die FS-Analyse entnommen. Diese Proben werden in den nächsten Monaten verarbeitet. Die Ergebnisse der FS-Analyse werden die Auswirkungen der verschiedenen Futtermittel auf das FS-Profil der Doradenlarven zeigen, und die Schlussfolgerungen zum biochemischen und ernährungsphysiologischen Wert von *A. panamensis* werden abgeschlossen sein. Unser Partner GMA hat während der zweimonatigen Versuchsdauer Daten über das Wachstum und die Sterblichkeit der Fischlarven gesammelt, die für eine erste Bewertung der Wirkung von *A. panamensis* auf die Leistung der Doradenlarven verwendet werden können, bevor die biochemischen Daten vorliegen.

---

## IMTE

---

---

### VERSUCHSAUFBAU UND ZUSAMMENFASSUNG DES ERSTEN VERSUCHS (KURZBEZEICHNUNG: NUTRIOLA, GENEHMIGT VON MINISTERIUM FÜR ENERGIEWENDE, LANDWIRTSCHAFT, UMWELT, NATUR UND DIGITALISIERUNG DES LANDES SCHLESWIG-HOLSTEIN, REFERAT TIERSCHUTZ UNTER DEM ZEICHEN V 24 – 39894/2020)

---

Im ersten Versuch wurden die Auswirkungen der Verwendung von Copepodennauplien (*Acartia tonsa*), einer hochwertigen Nahrungsquelle, getestet und die Effekte der Fütterung mit denen von angereicherten Rotatorien verglichen. Hierzu wurden 8 verschiedene Fütterungsregime getestet, um grundsätzlich festzustellen, welches zu einer erhöhten Überlebensrate, hohem Wachstum und verbesserter Qualität von Goldbrassenlarven führte.

Der Versuchszeitraum dieses Experimentes mit Goldbrassenlarven wurde auf deren frühe Entwicklungsstadien bis zu 60 dph beschränkt und vom 18.08.2020-15.10.2020 durchgeführt. Die eingesetzten Fütterungsregime sind im Detail in Abb. 53 dargestellt. Abweichend von der Standardgruppe - eine ausschließliche Rotatorienverfütterung mit nachfolgender Artemienverfütterung - wurden verschiedene Copepodenfütterungsphasen eingeführt, die sich in Menge und Zeitraum unterschieden. Bei allen Versuchsgruppen erfolgte ab Tag 25 dph eine Artemienfütterung bis zum Tag 45 dph, gefolgt von einer Trockenfutterphase bis zum Ende des Versuchs.

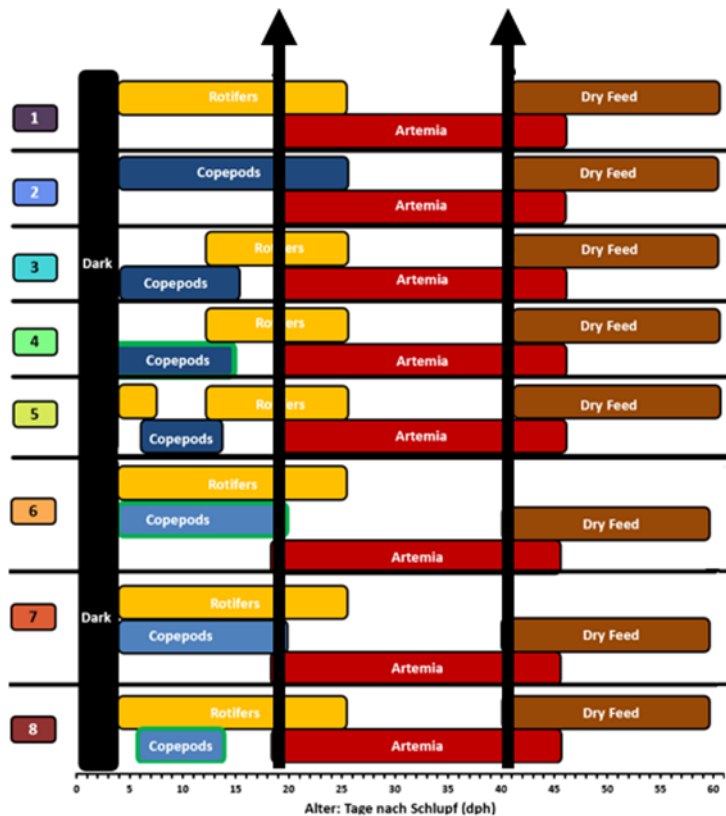


ABB. 53 DARSTELLUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN GRUPPEN (1-8). GRUPPE 1: STANDARD, SO WIRD ES INDUSTRIELL DURCHGEFÜHRT. GRUPPE 2: ERSATZSTRATEGIE FÜR GRUPPE 1, VERWENDUNG VON COPEPODEN ANSTATT ROTATORIEN. GRUPPEN 3 UND 4: ERGÄNZUNGSFÜTTERUNGSSTRATEGIEN, DIE SICH VONEINANDER UNTERSCHIEDEN, OB SIE VOR FÜTTERUNG MIT MIKROALGEN (*ISOCHRYSIS GALBANA* UND *RHODOMONAS SP.*; 2.000.000 CELLS PER ML, BLUEBIOTECH) ANGEREICHERT WURDEN ODER NICHT. GRUPPE 5: COPEPODENFÜTTERUNG EXPLIZIT BESCHRÄNKT AUF DEN ZEITRAUM DER SCHWIMMBLASENENTWICKLUNG. GRUPPEN 6 UND 7 („V-PILL“): HIER WURDEN ZUSÄTZLICH ZU EINER ROTATORIENDIÄT KLEINE MENGEN VON COPEPODEN VERFÜTTERT; SIE UNTERSCHIEDEN SICH VONEINANDER DARIN, OB DIE COPEPODEN VORHER MIT MIKROALGEN (S. O.) ANGEREICHERT WURDEN. GRUPPE 8: VERGLEICHBAR ZU GRUPPE 5, NUR ANGEREICHERTE COPEPODEN VERFÜTTERT

Dieser grundlegende Versuch zeigte eindrucksvoll auf, dass die Substitution der herkömmlichen Lebendfütterungsmittel mit einer nur geringen Menge von Copepodennauplien (16%) zu vergleichbaren Ergebnissen hinsichtlich Wachstumsleistung und Deformationen verglichen mit der vollständigen Copepoden-Fütterungsvariante führte (Abb. 54). Zudem wurden signifikante Unterschiede im Wachstumsverlauf zwischen den einzelnen Fütterungsregimen (z.B. ein exponentieller Anstieg des Wachstums nach Umstellung auf MD) festgestellt. Des Weiteren wurden ähnliche Überlebensraten von ca. 25% in allen Versuchsgruppen erzielt. Dies liegt im oberen Bereich dessen, was in der Industrie aktuell erreicht werden kann.

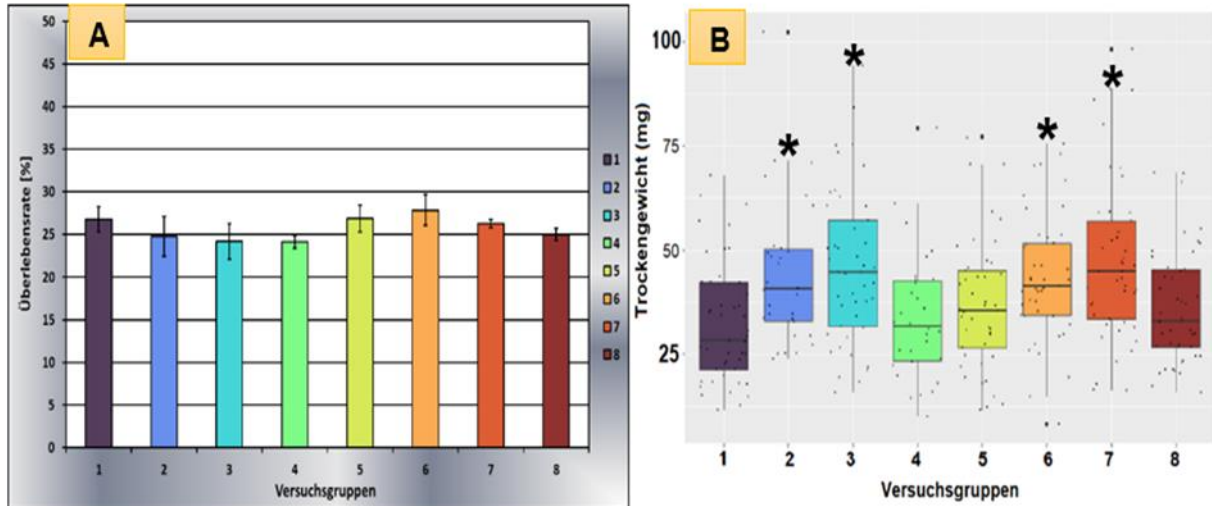


ABB. 54 A: ÜBERLEBENSRATE IN PROZENT (%) MIT STANDARDFEHLER (SE) INNERHALB DER VERSUCHSGRUPPEN AM ENDE DER AUFGUHT. B: GEWICHT (MG) DER GOLDBRASSENLARVEN FÜR 60 DPH. \* SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZUR STANDARDGRUPPE (VERSUCHSGRUPPE 1).

Das Auftreten von Deformationen ist ein bedeutendes Qualitätskriterium und ein wichtiges Thema in der Aufzucht vieler Meeresfischlarven, da Jungfische, die offensichtliche Abweichungen von der normalen Morphologie aufweisen, nicht von Aufzuchtbetrieben akzeptiert werden. Dies kann bis zu 30% der Brütereiproduktion betreffen und verursacht in der europäischen Aquakulturindustrie einen jährlichen Verlust von mehr als 50 Millionen Euro (Castro et al. 2008; Fernández et al. 2008; Haga et al. 2011). Bei Jungfischen der Goldbrasse sind Missbildungen der Wirbelsäule und der Schädelregion die häufigsten Deformationen, insbesondere Missbildungen an der Wirbelsäule, d. h. Lordose und/oder Kyphose sowie in der Schädelregion und am Kiemendeckel werden als schwerwiegend angesehen (siehe Abb. 56). Durch Anwendung histologischer Färbung wurde eine effiziente Erkennung und Quantifizierung von Deformationen ermöglicht (siehe Abb. 55 und Abb. 56). Basierend auf dem Fischkörperanteil, in dem die Deformationen auftraten, haben wir unterschieden in Deformationen der Wirbelsäule, der Kiemendeckel und des Schädels/Kiefer.



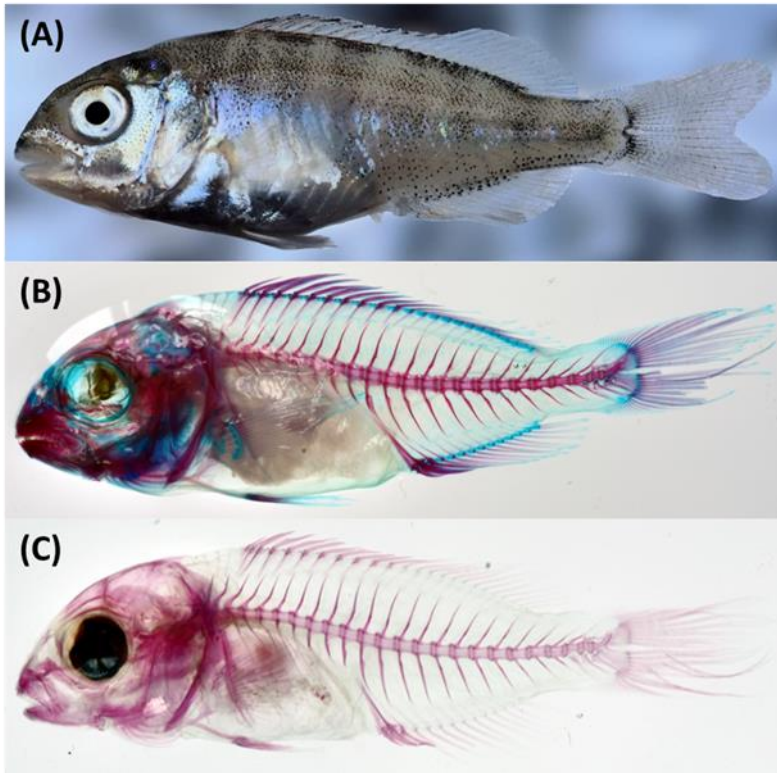


ABB. 55 GOLDBRASSENLARVEN BEI 60 DPH OHNE MISSBILDUNGEN: (A) OHNE DOPPELFÄRBUNG, (B) MIT DOPPELFÄRBUNG UND (C) OHNE KNORPELFÄRBUNG.

Im Vergleich zur Literatur wurde in diesem grundlegenden Versuch ein geringeres Auftreten von <math><15\%</math> der Wirbelsäulen- und Kiemendeckeldeformationen festgestellt. Dem gegenüber zeigte das Vorkommen von Schädeldeformationen innerhalb der Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Diese Ergebnisse werden auch in der Literatur aufgezeigt (siehe Abb. 57 C).

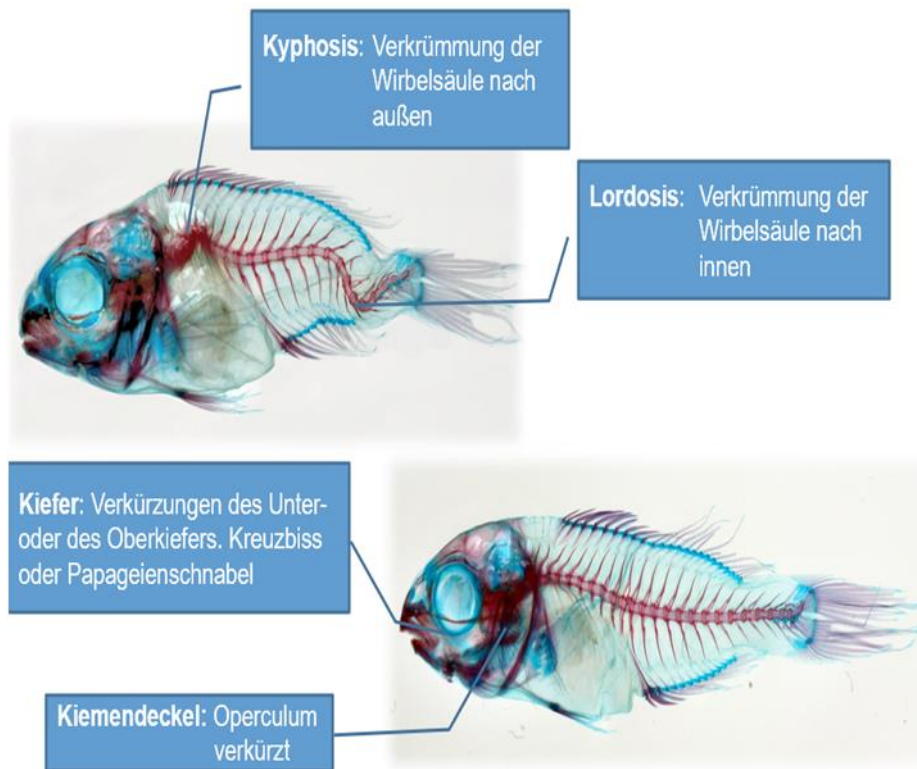


ABB. 56 BEISPIELE VERSCHIEDENER DEFORMATIONSTYPEN BEI GOLDBRASSENLARVEN (60 DPH)

Dieser Versuch macht deutlich, dass die Larvenbesatzdichte einen Einfluss auf das Auftreten der Wirbelsäulen- und Kiemendeckeldeformationen hat. Ein signifikanter Unterschied konnte für Wirbelsäulendeformationen in Versuchsgruppe 6 vergleichend zur Standardgruppe ermittelt werden und ist höchstwahrscheinlich auf eine anfänglich erhöhte Besatzdichte zurückzuführen (siehe Abb. 57 A). Im Bereich des Kiemendeckels wurde für Versuchsgruppe 4 das Gegenteil nachgewiesen. Das Auftreten dieses Deformationstyps ist hier aufgrund einer geringeren Besatzdichte reduziert (siehe Abb. 57 B).

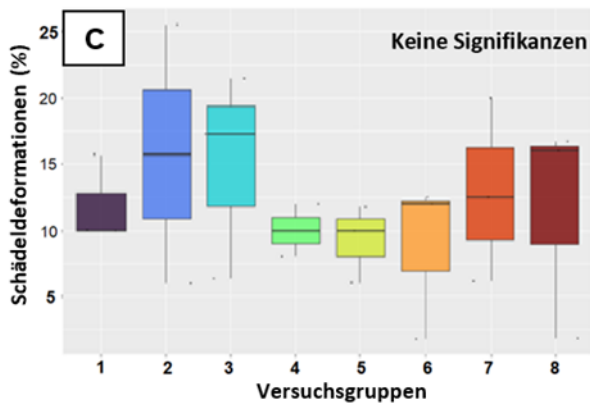
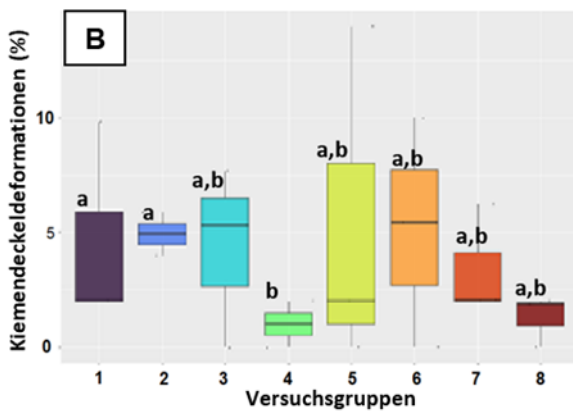
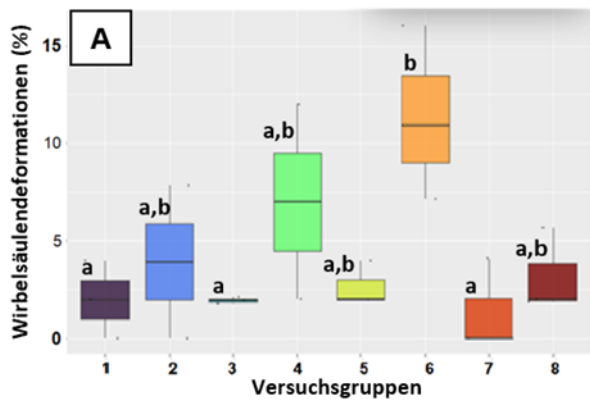


ABB. 57 ANZAHL DER A: WIRBELSÄULEN- B: KIEMENDECKEL- UND C: SCHÄDELDEFORMIATIONEN INNERHALB DER VERSUCHSGRUPPEN IN PROZENT (%). UNTERSCHIEDLICHE BUCHSTABEN STEHEN FÜR SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZUR STANDARDGRUPPE (VERSUCHSGRUPPE 1).

VERSUCHSAUFBAU UND ZUSAMMENFASSUNG DES ZWEITEN VERSUCHS  
 (KURZBEZEICHNUNG: OPTIPODE GENEHMIGT VON MINISTERIUM FÜR  
 ENERGIEWENDE, LANDWIRTSCHAFT, UMWELT, NATUR UND DIGITALISIERUNG DES  
 LANDES SCHLESWIG-HOLSTEIN, REFERAT TIERSCHUTZ UNTER DEM ZEICHEN V 242 –  
 40658/2020)

Aufgrund der Erkenntnisse aus dem ersten Versuch wurde im zweiten Versuch von Fütterungsbeginn an eine geringere Fischlarvenbesatzdichte verwendet. Hierzu wurden sechs von den acht vorherigen Fütterungsregimen optimiert hinsichtlich Futteraufnahme, Fütterungsmengen und Fütterungszeiten und mit neuen Fütterungssystemen verglichen. Die sechs Fütterungsregime waren innovative Weiterentwicklungen der Fütterungsregimen des ersten Versuchs, wobei die Fütterungsdauer der Rotatorien und Copepoden weiterhin verkürzt und damit die Umstellung auf MD für alle Versuchsgruppen um 10 Tage vorgezogen wurde (siehe Abb. 58). Zwei der sechs Versuchsgruppen (Gruppen 4 und 5) erhielten eine noch frühere Umstellung auf MD ab Tag 18 dph, womit eine Artemienfütterungsphase bei diesen beiden Versuchsgruppen vollständig ausgelassen wurde. Zudem wurde in diesem Versuch eine neue MicroDiet-Rezeptur der Firma Molofeed eingesetzt und mit einem kommerziell hergestellten MD verglichen. Zur Vergleichbarkeit der beiden experimentellen Einstellungen wurde wiederum mit Goldbrassen gearbeitet. Der Versuch wurde vom 26.04.2021 bis 07.06.2021 praktisch umgesetzt (von Tag 4 dph bis Tag 45 dph).

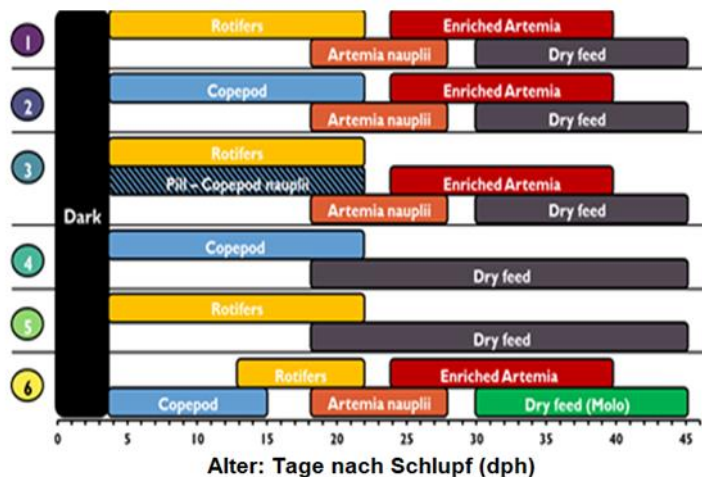


ABB. 58 DARSTELLUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN VERSUCHSGRUPPEN (1-6). GRUPPE 1: STANDARD, SO WIRD ES INDUSTRIELL DURCHGEFÜHRT. GRUPPE 2: ERSATZSTRATEGIE FÜR GRUPPE 1, VERWENDUNG VON COPEPODEN ANSTATT ROTATORIEN, UND DIE FÜTTERUNGSZEITRÄUME OPTIMIERTE. GRUPPE 3 („V-PILL“): HIER WURDEN ZUSÄTZLICH ZUR ROTATORIENDIÄT KLEINE MENGEN VON COPEPODEN VERFÜTTERTE UND DIE FÜTTERUNGSZEITRÄUME OPTIMIERTE. GRUPPEN 4 UND 5: NEUARTIGER FÜTTERUNGSANSATZ, KEINE ARTEMIENFÜTTERUNG, SONDERN DIREKTE UMSTELLUNG AUF MD. GRUPPE 6: EINSETZUNG EINES NEUARTIGES MD

Aufgrund eines parasitären Befalls der Goldbrassenlarven zu Versuchsbeginn wurde ein Versuchstank mit sehr hoher Mortalität aus der vergleichenden Ergebnisanalyse ausgeschlossen. Dennoch deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass das Wachstum der Goldbrassenlarven bei allen Versuchsgruppen durch diese Stresssituation nicht grundsätzlich beeinträchtigt wurde.

Die Ergebnisse des zweiten Versuchs weisen darauf hin, dass die Gruppe, die während der Fütterungsphase der gesamten Versuchsdauer Copepoden erhielt, die höchste Überlebensrate bei gleichzeitig hohem Wachstum aufwies (Versuchsgruppe 2; Abb. 59 A). Das Auslassen einer Artemienfütterung und die frühere Umstellung auf MD ab Tag 18 dph führte zu einer erheblichen Verminderung der Überlebensrate bei den Versuchsgruppen 4 und 5.

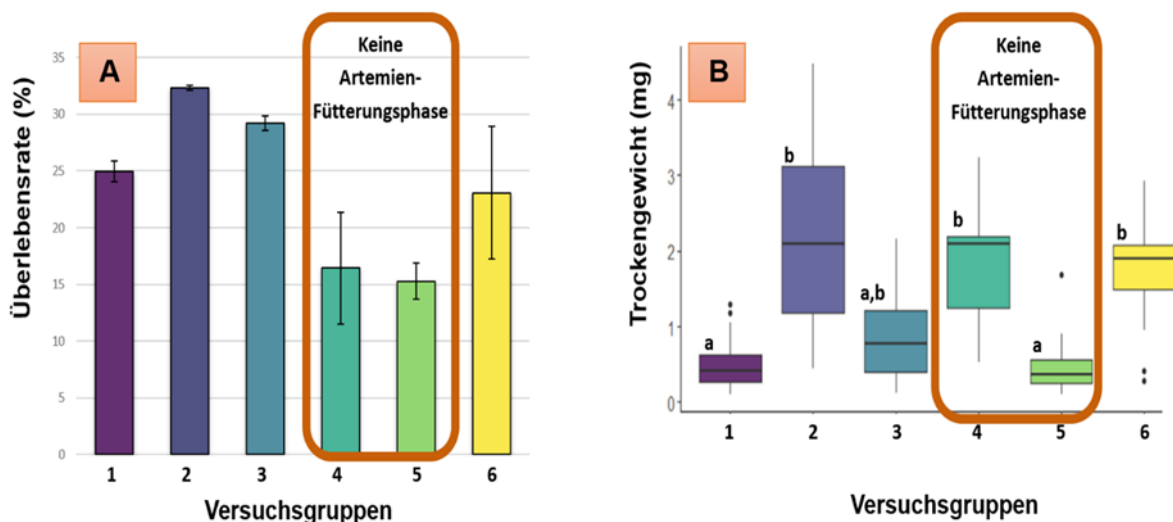


ABB. 59 A: ÜBERLEBENSRATE IN PROZENT (%) MIT STANDARDFEHLER (SE) INNERHALB DER VERSUCHSGRUPPEN AM ENDE DER AUZUCHT. B: GEWICHT (MG) DER GOLDBRASSENLARVEN BEI 45 DPH. UNTERSCHIEDLICHE BUCHSTABEN STEHEN FÜR SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZUR STANDARDGRUPPE (VERSUCHSGRUPPE 1).

Die Gewichtszunahme während der Beobachtungsphase zeigte, dass die Fütterungsregime mit anfänglicher Copepodendiät ein deutlich höheres Wachstum der Goldbrassenlarven im Vergleich zur praxisrelevanten Standardgruppe (1) aufwiesen (siehe Abb. 59 B).

Unterschiede in den Wachstumsparametern zwischen den Larven mit Copepodendiät und Rotatoriendiät konnten bereits während der ersten 24 Tage festgestellt werden. Diese Unterschiede stiegen gegen Ende des Versuchs noch an, wodurch die Bedeutung einer anfänglichen Copepodenfütterung unterstrichen wird. Darüber hinaus zeigen unsere Ergebnisse, dass die beiden Gruppen, bei denen ein früherer Umstieg auf MD erfolgte (siehe

Abb. 60, Gruppen 4 und 5), ähnliche Wachstumsergebnisse aufwiesen wie deren Vergleichsgruppen 2 und 1. Durch die niedrigere Überlebensrate ist wahrscheinlich das höhere Wachstum der verbleibenden Goldbrassenlarven in diesen beiden Versuchsgruppen zu erklären.

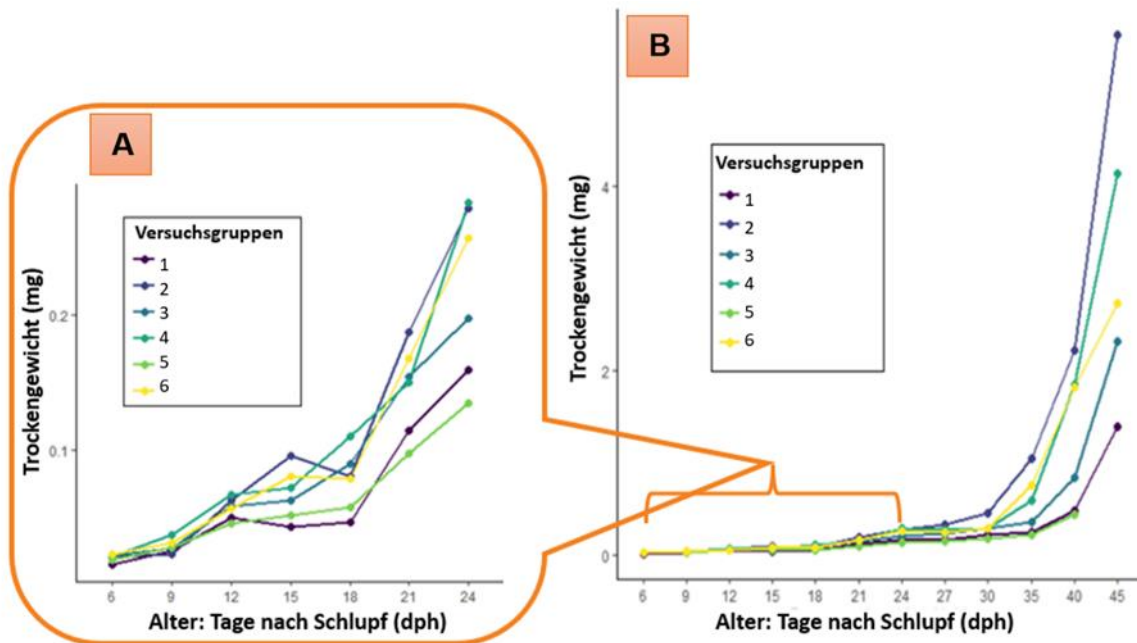


ABB. 60 TROCKENGEWICHT DER LARVEN (MG) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ANZAHL DER TAGE NACH DEM SCHLÜPFEN (DPH) VON FÜNF VERSCHIEDENEN FÜTTERUNGSREGIMEN. A: ROTATORIEN VS. COPEPODEN-FÜTTERUNGSPHASE (6 DPH - 24 DPH). B: LARVENWACHSTUM INNERHALB VERSUCHSGRUPPEN WÄHREND DER AUFGUHT (6 DPH - 45 DPH).

Abschließend ist hervorzuheben, dass sich die anfängliche Copepodenfütterung deutlich positiv auf die Überlebensrate und das Gesamtwachstum auswirkt. Eine deutliche Steigerung der Überlebensrate und des Wachstums ist aus wirtschaftlicher Sicht und vor allem aus Sicht des Tierwohls von sehr großer Bedeutung. Interessanterweise führte der Verzicht der Artemienfütterung und damit einer früheren Umstellung auf MD zu einer geringeren Überlebensrate, bei tendenziell gleichem Wachstum. Dies wurde insbesondere für die Gruppe, die eine anfängliche Copepodendiät erhielt, aufgezeigt.

Derzeit wird das Mikrobiom in Goldbrassenlarven, Futter und Wasser der unterschiedlichen Versuchsgruppen analysiert. Erste Ergebnisse deuten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen an. Es konnte zu bestimmten Zeitpunkten eine Clusterbildung zwischen den verschiedenen Probenarten nachgewiesen werden (siehe Abb. 61). Dies deutet darauf hin, dass es Unterschiede in den Mikrobiomprofilen zwischen den Fütterungsregimen gibt.

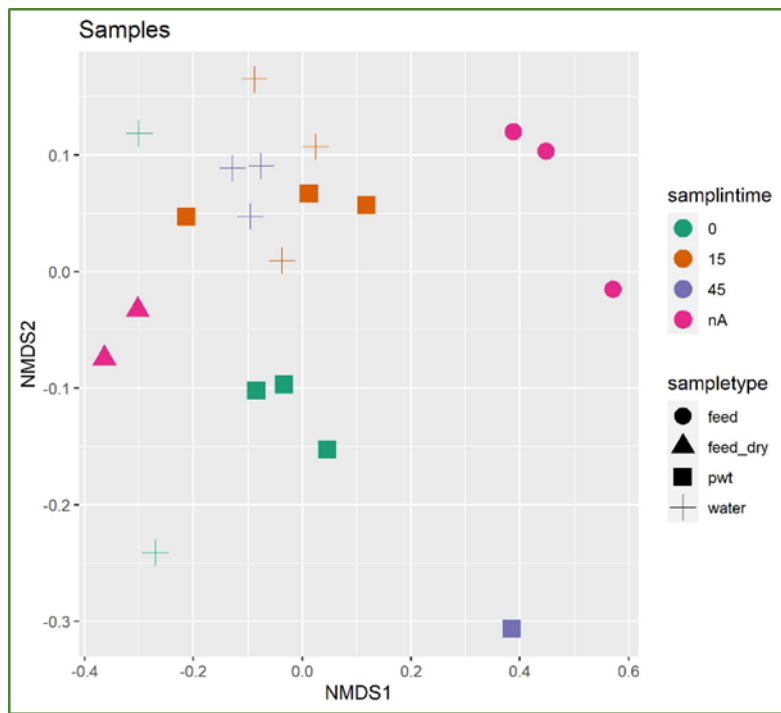


ABB. 61 UNTERSCHIEDE IN DEN GATTUNGSGEMEINSCHAFTEN DER VERSCHIEDEN PROBENTYPEN ; QUADRAT = LARVEN, KREIS = LEBENDFUTTER, DREIECK = TROCKENFUTTER UND KREUZ = WASSER. IN ABHÄNGIGKEIT VON BESTIMMTEN ZEITPUNKTEN DER LARVENAUZUCHT (HIER IM BETA-DIVERSITÄTSTEST ALS KREIS); GRÜN = 0 DPH, ORANGE = 15 DPH, LILA = 45 DPH.

---

**VERSUCHSAUFBAU UND ZUSAMMENFASSUNG DES DRITTEN VERSUCHS  
(KURZBEZEICHNUNG: NUTRILARVA GENEHMIGT VON MINISTERIUM FÜR  
ENERGIEWENDE, LANDWIRTSCHAFT, UMWELT, NATUR UND DIGITALISIERUNG DES  
LANDES SCHLESWIG-HOLSTEIN, REFERAT TIERSCHUTZ UNTER DEM ZEICHEN V 244 –  
68534/2021)**

---

Da sich in den vorangegangenen Versuchen gezeigt hat, dass man durch die Fütterung von Nauplien der Art *Acartia tonsa* eine deutlich bessere Wachstumsleistung, eine höhere Überlebensrate und weniger Deformationen in der Aufzucht von Goldbrassenlarven erreichen kann, wurde im dritten Versuch der Einsatz einer neuen Copepodenart (*Apocyclops panamensis*) evaluiert. Da die meisten Copepodenarten nur begrenzt kommerziell verfügbar sind, ist es unerlässlich, möglichst viele, potentiell geeignete Arten zu evaluieren, um den vielfältigen Nahrungsbedarf verschiedener Meeresfische zu decken. Es wurde untersucht, ob die Fütterung der neuen Copepodenart zu einer weiteren Verbesserung der Überlebens- und Wachstumsrate sowie Verminderung von Deformationen der Fischlarven führen konnte.

In Verbindung mit einer für die Erstfütterung idealen Nährstoffzusammensetzung wurde in diesem Versuch der Effekt einer gleichzeitigen Fütterung einer Copepoden- oder Rotatoriendiät mit MD ab Erstfütterung untersucht. Zudem sollte in diesem Versuch festgestellt werden, inwieweit sich eine geringere Menge angereicherter Artemien auf die Entwicklung der Larven auswirkt; im Gegensatz zu den Gruppen, in denen diese Phase der Verfütterung entweder ganz ausgelassen wurde (siehe Abb. 62 ; Versuchsgruppen 3, 4 und 5) oder zu 100% vorhanden war (Standardgruppe 1). Mit einer möglichen reduzierten Verwendung von Artemien würden sich erhebliche Einsparungen bei den Futterkosten, dem Platzbedarf und der Arbeitskraft erzielen lassen. Der Versuch wurde mit Goldbrassenlarven vom 05.04.2022 bis 30.05.2022 praktisch umgesetzt (von Tag 4 dph bis Tag 56 dph).

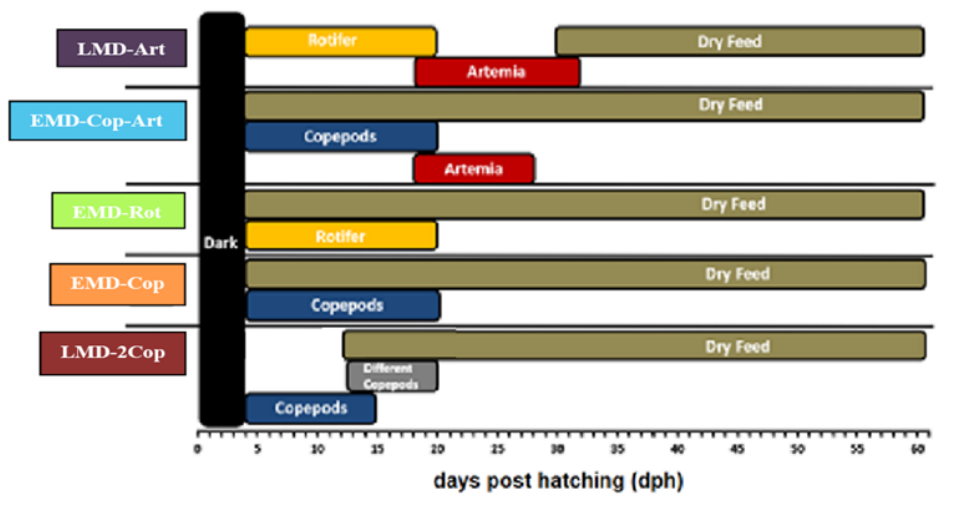


ABB. 62 EINFLUSS VERSCHIEDENER FÜTTERUNGSREGIME AUF DIE LEISTUNG DER GOLDBRASSE BEI EINFÜHRUNG EINER FRÜHEREN TROCKENFÜTTERUNG, VERSUCH 3 (NUTRILARVA). BEHANDLUNGSABKÜRZUNGEN: LMD-ART: SPÄTE UMSTELLUNG AUF TROCKENFUTTER UND ARTEMIEN (STANDARD)-DIÄT; EMD-COP-ART: FRÜHE UMSTELLUNG AUF TROCKENFUTTER UND EINE COPEPODEN/ARTEMIEN-DIÄT; EMD-ROT: FRÜHE UMSTELLUNG AUF TROCKENFUTTER UND ROTATORIENDIÄT; EMD-COP: FRÜHE UMSTELLUNG AUF TROCKENFUTTER UND COPEPODEN-DIÄT; LMD-2COP: SPÄTERE UMSTELLUNG AUF TROCKENFUTTER UND ZWEI ARTEN VON COPEPODEN.

Fünf verschiedene Fütterungsregime wurden in vierfacher Ausfertigung getestet und nach dem Zufallsprinzip vier verschiedenen Aufzuchtbecken zugewiesen, die jeweils mit 4 500 Goldbrassenlarven bestückt waren (Dichte von 75 Larven pro Liter). Drei der fünf Gruppen erhielten vom Beginn der Fütterung an (4 dph) eine Co-Fütterungsstrategie mit entweder Rotatorien (Behandlungskürzel: EMD-Rot), die mit S. Presso (INVE) angereichert wurden, oder frisch geschlüpfte Copepodennauplien (Behandlungskürzel: EMD-Cop und EMD-Cop-Art) bis 20 dph, plus kommerzielles MD (MDs, GEMMA Neo, Skretting; siehe Abb. 62). Bei einem weiteren Fütterungsregime wurde eine Umstellung ab 15 dph auf MD und ein



Wechsel von Copepoden *Acartia tonsa* zur Copepodenart *Apocyclops panamensis* getestet (Behandlungskürzel: LMD-2Cop), während bei dem anderen das Standard-Lebendfutterprotokoll mit einer Umstellung auf MD ab 30 dph getestet wurde und eine umfangreiche Artemia-Fütterungsphase von 18 bis 33 dph erfolgte (Behandlungskürzel: LMD-Art). Je nach Umstellung auf MD innerhalb der verschiedenen Fütterungsregime wurde die Menge der MD an das Alter und die Besatzdichte der Larven angepasst (letztere nahm aufgrund der intensiven Probeentnahme während der Aufzucht mit der Zeit ab). Die MD wurden über ein automatisches Fütterungssystem (HFS-F Feeder & HFS-P Control, NutraKol, Australien) verabreicht; die Fütterungszeitpunkte sowie die Futtergabe wurden mit zunehmendem Alter der Larven schrittweise erhöht (vgl. Abb. 63).

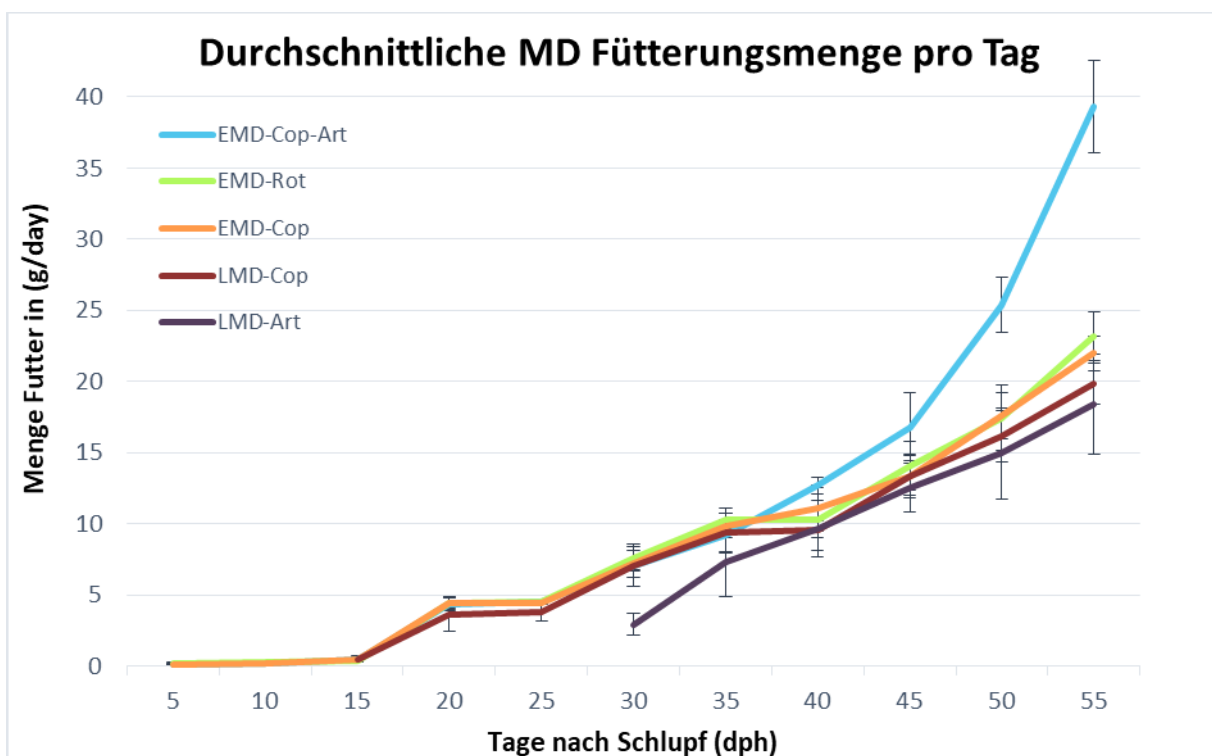


ABB. 63 DURCHSCHNITTliche MEnGE DER GEFÜTTERTEn MDS IN G PRO TAG FÜR JEDE VERSUCHSGRUPPE WÄHREnD DES GESAMTEn VERSUCHS. DAS FUTTER WURDE 16 STUNDEN PRO TAG VERABREICHT UND ENTSPRECHEND DER ENTWICKLUNG DER LARVEN EXPONENTIELL ERHÖHT. DIE FUTTERMENGE WURDE TÄGLICH IN ALLEN 20 BECKEN AUFGEZEICHNET (VIERFACHE WIEDERHOLUNGEN FÜR JEDE VERSUCHSGRUPPE) UND SPÄTER AUF EINER 5-TAGE-BASIS ZUSAMMENGEFASST, MIT STANDARDABWEICHUNG (SD).

Am Ende der Aufzucht war die Überlebensrate bei der Versuchsgruppe EMD-Cop-Art etwa 15 % höher als bei der Standardgruppe (LMD-Art;  $37.5 \pm 2.62$  Abb. 64). Larven, die bei der Erstfütterung eine Co-Fütterungsstrategie von Copepodennauplien mit MD erhielten, erreichten eine höhere Überlebensrate im Vergleich zur Standardgruppe. Die

Versuchsgruppe LMD-Rot, die von Beginn an mit Rotatorien und MD gefüttert wurde und ab 20 dph nur noch Trockenfutter erhielt, zeigte mit  $19,7 \pm 2,62$  % die geringste Überlebensrate.

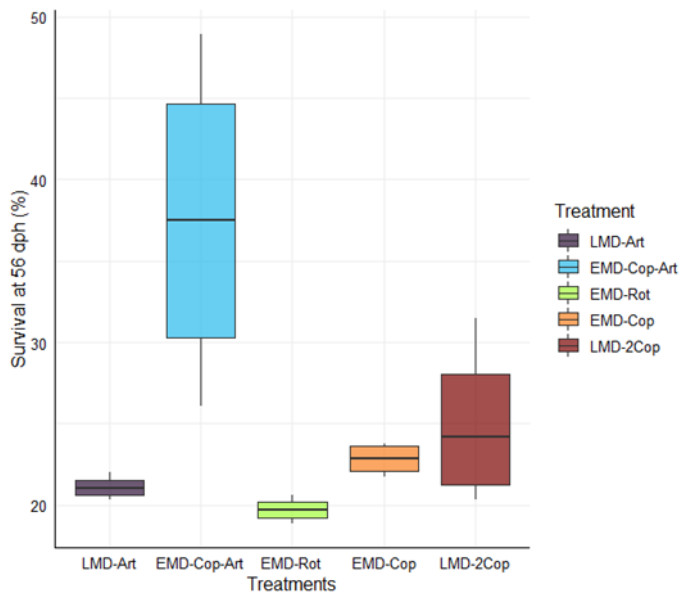


ABB. 64 ÜBERLEBENSRATE IN PROZENT (%) INNERHALB JEDER VERSUCHSGRUPPE AM ENDE DES VERSUCHS

Am Ende des Versuchs war der prozentuale Anteil der Überlebenden bei den Versuchsgruppen, die mit Copepodennauplien (*Acartia tonsa*) gefüttert wurden, signifikant höher als bei den Versuchsgruppen, die eine Rotatoriendiät erhielten (siehe Abb. 64 und Abb. 65). Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Co-Fütterungsstrategie mit MD von Beginn an zu weniger Larvenverlusten in den Versuchsgruppen führte, die entweder Rotatorien oder *Acartia tonsa* erhielten, d. h. LMD-Rot und EMD-Cop-Art, EMD-Cop (siehe Abb. 65). Die höchste Sterblichkeit an Larven wies die Standardgruppe auf.

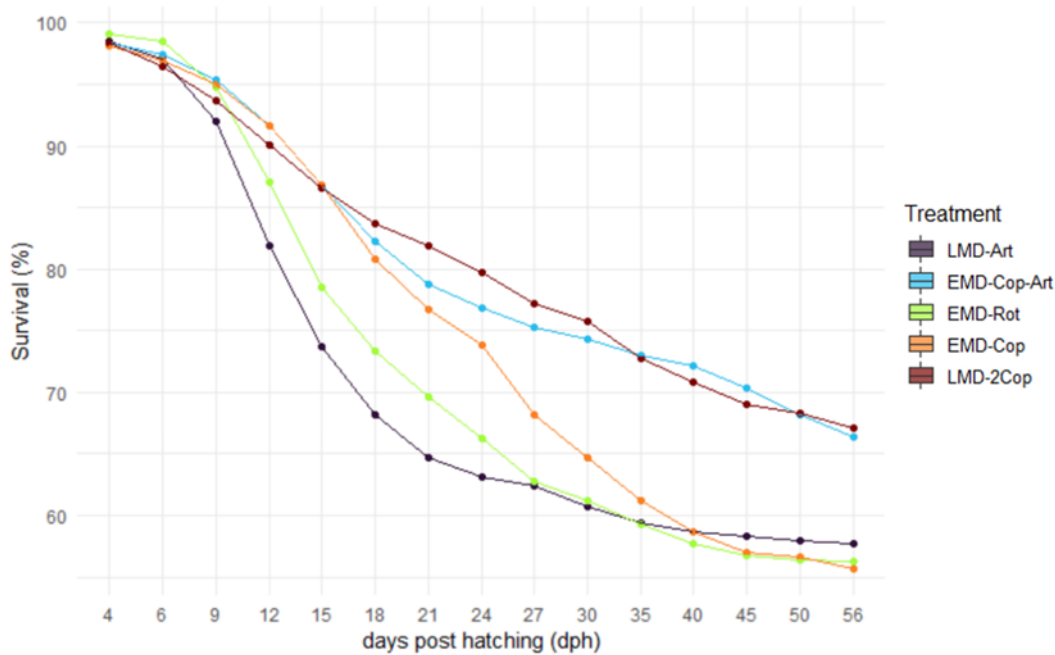


ABB. 65 KUMULATIVE STERBLICHKEIT VON 4 DPH BIS ZUM ENDE DES VERSUCHS INNERHALB JEDER VERSUCHSGRUPPE

Während der Rotatorien- vs. Copepodenfütterungsphase zeigte sich ein signifikant positiver Effekt auf das Trockengewicht und die Länge der mit *Acartia tonsa* gefütterten Fischlarven (Abb. 66 A). Die Einführung von MD ab der ersten Fütterung erwies sich als äußerst erfolgreich und stieß bei den Larven der drei Versuchsgruppen (EMD-Cop-Art, EMD-Rot und EMD-Cop) auf große Akzeptanz. Dies wurde besonders sichtbar beim Vergleich des Trockengewichts und der Länge der Fischlarven der EMD-Rot und der Standardgruppe (LMD-Art). Am Ende dieser Fütterungsphase und während des Übergangs zur reinen MD- und/oder Artemienfütterung (Tag 24 dph) zeigte die Versuchsgruppe EMD-Cop-Art die höchsten Wachstumsleistungen, die signifikant oberhalb der Standardgruppe (Abb. 66 B; DW  $p = <0,001$  und SL  $p = 0,047$ ) lagen.

Im Verlauf der Artemienfütterungsphase erhielten die Larven in der Versuchsgruppe EMD-Cop-Art nur für eine kurze Zeit (9 Tage) eine Artemiendiät, die zusammen mit MD gefüttert wurde. Das Hinzufügen einer Artemiendiät innerhalb dieser Versuchsgruppe führte dazu, dass die Larven in dieser Gruppe bei beiden Merkmalen (Trockengewicht und Gesamtlänge) deutlich über den Werten aller Versuchsgruppen lagen (Abb. 66B). Außerdem wird deutlich, dass eine extrem frühe ausschließliche Trockenfutterdiät ab Tag 20 dph für die Versuchsgruppen EMD-Rot und EMD-Cop starke Auswirkungen zeigte. Die Larven in Versuchsgruppe EMD-Rot wiesen ein deutlich geringeres Trockengewicht auf im Vergleich zu den weiteren Versuchsgruppen am Tag 24 dph (Abb. 66 B).

Ab Tag 30 dph erhielten alle Versuchsgruppen nur noch eine MD-Diät. Hierbei relativierte sich der Wachstumsvorteil der Versuchsgruppe EMD-Cop-Art aus der Artemienfütterungsphase (Abb. 66 C). Während der MD Verabreichung konnten erhöhte Wachstumsleistungen in der Standardgruppe festgestellt werden. Eine geringere Larvendichte aufgrund höherer Mortalität innerhalb dieser Versuchsgruppe könnte das festgestellte kompensatorische Wachstum innerhalb dieser Versuchsgruppe erklären.

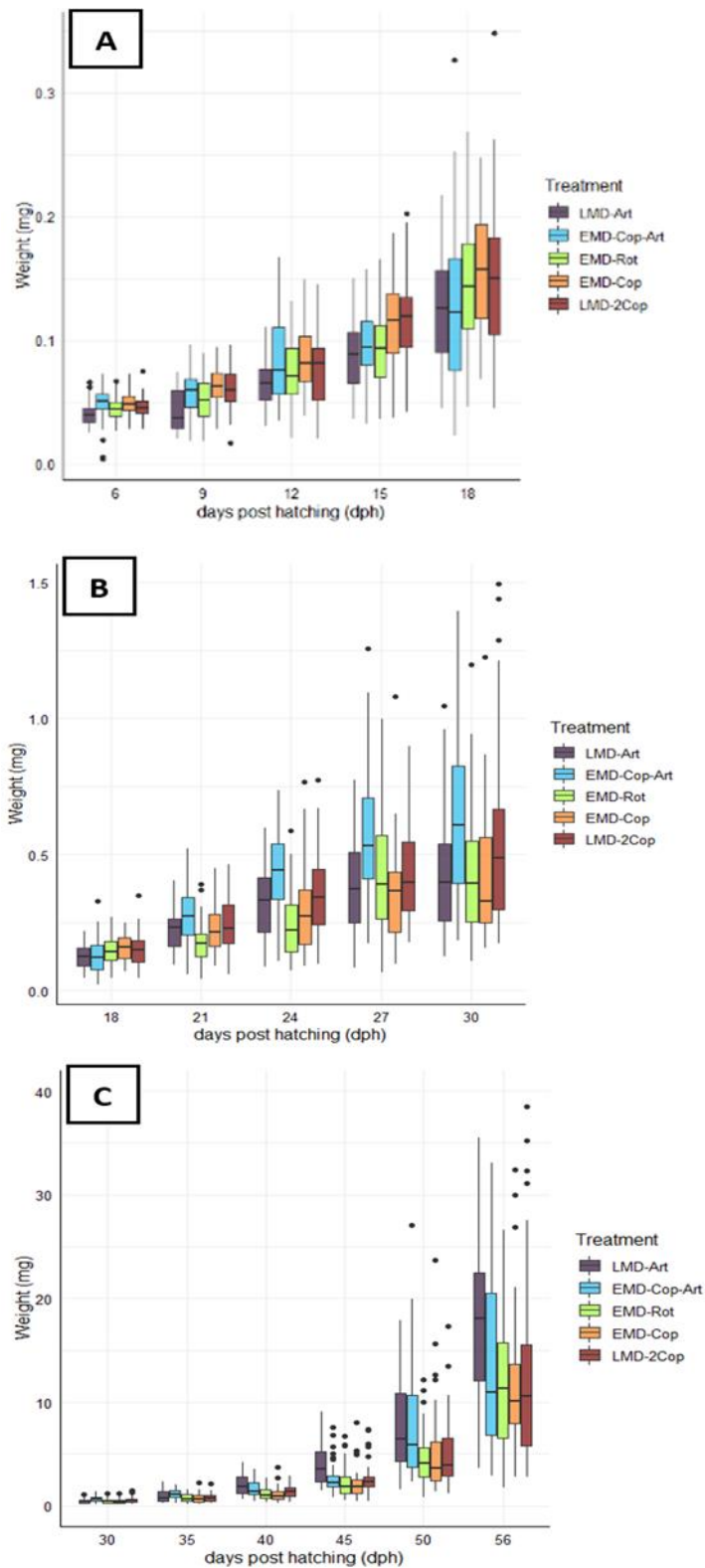


ABB. 66 TROCKENGEWICHT DER LARVEN (MG) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ANZAHL DER TAGE DPH BEI DER ERPROBUNG VON FÜNF VERSCHIEDENEN FÜTTERUNGSREGIMEN. A: ROTATORIEN- VS. COPEPODENFÜTTERUNGSPHASE (6 DPH - 20 DPH); B: ARTEMIENFÜTTERUNGSPHASE (18 DPH - 30 DPH) UND C: MD-FÜTTERUNGSPHASE (30 DPH - 56 DPH). N.B. DIE UNTERSCHIEDLICHE SKALIERUNG DER Y-ACHSE VON A, B UND C.

## ÖFFENTLICHKEITSARBEIT

---

Die Projektergebnisse zu den jeweiligen Versuchen werden derzeit für die Veröffentlichung in Fachjournalen vorbereitet. Aufgrund der Corona-Pandemie erwiesen sich die Möglichkeiten zur internationalen Netzerkennung und Präsentation problematisch. Jedoch wurden die Forschungsergebnisse während der drei Jahre national präsentiert. Des Weiteren wurden im Rahmen des Projektes zwei Bachelorarbeiten, eine Masterarbeit und eine Dissertation angefertigt.

### **Juni 2022, Seminar zur aktuellen Forschung, Kiel**

Optimised feeding regimes with copepod *Acartia tonsa* and their effects on performance of sea bream larvae (*Sparus aurata*)

### **Juni 2022, 13. Büsumer Fishtag, Büsum**

Optimierte Fütterungsregime mit Copepoden und deren Auswirkungen auf die Leistungsfähigkeit von Doraden Larven (*Sparus aurata*)

### **Januar 2022, Seminar zur aktuellen Forschung, Kiel**

Different feeding regimes using copepod *Acartia tonsa* changed performance of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae

### **Juni 2021, Seminar zur aktuellen Forschung, Kiel**

Different feeding regimes using copepod *Acartia tonsa* changed performance of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae

### **Juni 2021, 12. Büsumer Fishtag, Büsum**

Different feeding regimes using copepod *Acartia tonsa* changed performance of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae

### **Januar 2021, Seminar zur aktuellen Forschung, Kiel**

Impact of different feeding regimes of copepod *Acartia tonsa* on performance of Sea Bream larvae (*Sparus aurata*)

## FAZIT

---

Die Optimierung der Kultivierungsbedingungen aller untersuchter Mikroalgenarten (*Rhodomonas salina*, *Isochrysis galbana*, *Tetrasemis chuii*) konnte erfolgreich durchgeführt werden. Zum Teil konnte die Mediumzusammensetzung angepasst werden um Kosten zu sparen. Die erreichbare Zelldichte konnte in den Photobioreaktoren bzw. durch mechanische Aufkonzentrierung erhöht werden. Die Lagerfähigkeit der Zellkonzentrate konnte bei allen Algen optimiert werden. Ein lagerfähiges Algenkonzentrat mit hoher Zelldichte ist ein wesentliches Kriterium für den effizienten Einsatz von Mikroalgen in der Copepodenzucht. So können die Mikroalgen dezentral produziert werden und kosteneffizient an die Copepodenzüchter versendet werden. Lediglich die Lagerfähigkeit von *Rhodomonas* ist mit 4-5 Tagen sehr gering und sollte in weiteren Untersuchungen möglichst verlängert werden.

Die Optimierung der Copepodenproduktion konzentrierte sich auf die Kultivierung des zyklipoiden Copepoden *Apocyclops panamensis* als potenzielle Spezies für die Verwendung als Futtermittel und Zusatz zum Futter für Fischlarven in der europäischen Aquakultur. *A. panamensis* zeigte einige vorteilhafte Eigenschaften als Lebendfuttermittelkandidat: schnelle Reproduktionsraten, die Fähigkeit, in den Tankkulturen eine hohe Dichte von bis zu 40 Ind. ml<sup>-1</sup> zu erreichen, was die höchste Dichte ist, die bei Lebendkulturen von Copepoden erreicht wird. Darüber hinaus hat *A. panamensis* die volle enzymatische Kapazität zur Biosynthese von langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (LC-PUFA), einschließlich Omega-3-Fettsäuren wie EPA und DHA. Weitere Versuche sollten darauf abzielen, die Auswirkungen der Temperatur auf die Expression von Genen zu bestimmen, die für die Synthese von LC-PUFA in *A. panamensis* verantwortlich sind, um so eine eventuelle Optimierung zu erreichen.

Unter Verwendung der in diesem Projekt optimierten Mikroalgen und Copepoden wurden Fütterungspraktiken sowie Futterkomponenten evaluiert und optimiert. Diese Untersuchungen tragen zur Verbesserung der Fütterungsprotokolle bei und es wurde erstmals der Nutzen einer kombinierten Erstfütterung von Trocken- und Lebendfutter für eine marine-Art aufgezeigt.

Im ersten Versuch wurden die Auswirkungen des Einsatzes von Copepodennauplien als Teil konventioneller Fütterungsregime auf die Leistung von Goldbrassenlarven untersucht. Interessanterweise deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass selbst mit einer geringen Menge von Copepodennauplien (16 %) ähnliche Ergebnisse hinsichtlich Wachstumsleistung und Deformationen erzielt werden konnte wie mit der vollständigen Copepodenfütterungsvariante. Des Weiteren wurden ähnliche Überlebensraten von ca. 25%

in allen Versuchsgruppen erzielt. Zudem machte dieser Versuch deutlich, dass die Larvenbesatzdichte einen Einfluss auf das Auftreten von Wirbelsäulen- und Kiemendeckeldeformationen hat.

Durch die Weiterentwicklung der getesteten Fütterungsregime wurden im zweiten Versuch die Zeiträume und Mengen der verschiedenen Futtermittel optimiert und der Einfluss einer frühen Umstellung auf Trockenfutter auf die bereits erwähnten Merkmale untersucht. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass sich die anfängliche Copepodenfütterung deutlich positiv auf die Überlebensrate und das Gesamtwachstum auswirkt. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Verzicht einer Artemienfütterung und damit eine frühere Umstellung auf MD (Trockenfutter) einen entscheidenden negativen Einfluss auf die Überlebensrate, bei tendenziell gleichem Wachstum, zur Folge hatte. Dies wurde insbesondere für die Gruppe, die eine anfängliche Copepodendiät erhielt, aufgezeigt. Darüber hinaus war es möglich, eine noch nicht vollständig abgeschlossene Analyse des Mikrobioms der Futtermittel, Fischlarven und Haltungswasser durchzuführen, da neben der Optimierung des Futtermittels und der Futterkonzentration des Lebendfutters auch verstärkt auf die Hygiene und potentielle Kontaminationen mit Fremdorganismen geachtet werden muss. Die bisher hierbei erzielten und aufgezeigten Ergebnisse deuten auf vielversprechende Unterschiede in der Bakteriengemeinschaft zwischen den verschiedenen Probenarten hin.

Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche wurde in der abschließenden Studie der Effekt einer gleichzeitigen Fütterung einer Copepoden- oder Rotatorienfütterung mit MD ab Erstfütterung untersucht sowie der Einsatz einer neuen Copepodenart evaluiert. Zudem war ein weiteres Ziel dieser Studie festzustellen, inwieweit sich eine geringere Menge angereicherter Artemien auf die Entwicklung der Larven auswirkt. Grundsätzlich zeigten die Ergebnisse, dass eine Einführung von MD ab Erstfütterung bei gleichzeitiger Zugabe von Lebendfutter keine nachteiligen Auswirkungen auf die Überlebensrate, Wachstum und funktionelle Entwicklung des Verdauungssystems hatte. Im Gegensatz, zeigte es sich, dass eine Co-Fütterungsstrategie mit MD von Beginn an zu weniger Larvenverlusten sowie einer eventuellen früheren Reifung des Darms laut Trypsinaktivitäten führte. Des Weiteren zeigte eine Zugabe von Artemien eine deutliche Erhöhung der Trypsinaktivität, die gekoppelt war an eine Zunahme des Trockengewicht sowie Gesamtlänge der Goldbrassenlarven.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zeigten deutlich, dass eine Co-Fütterung von Lebendfutter (insbesondere Copepoden) mit MD ab Erstfütterung als effektivstes sowie kosteneffizientestes Fütterungsprotokoll für die Aufzucht von Goldbrassenlarven dienen könnte. Dies liegt daran, dass das Fütterungsprotokoll das Potenzial hat, das Lebendfutter



kosteneffizient zu reduzieren ohne die Überlebensrate oder Leistung der Larven erheblich zu beeinträchtigen, da die Zugabe von Trockenfutter die Gefahr des Unterfütterns der Goldbrassenlarven minimiert.

Insgesamt konnten einzelne Komponenten bei der Produktion von Mikroalgen und Copepoden optimiert werden und damit der Einsatz der hochwertigen, aber relativ kostenintensiven Copepoden im Rahmen von Fütterungsregimes effizienter gestaltet werden.

## LITERATUR

---

- Aragão, C., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T. and Fyhn, H.-J. (2004) Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture*. 234, 429-445.
- Bell, M. V., & Tocher, D. R. (2009). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. *Lipids in aquatic ecosystems*, 211-236.
- Boyen, J., Fink, P., Mensens, C., Hablützel, P. I., & De Troch, M. (2020). Fatty acid bioconversion in harpacticoid copepods in a changing environment: a transcriptomic approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1804), 20190645.
- Boyen, J., Ribes-Navarro, A., Kabeya, N., Monroig, O., Rigaux, A., Fink, P., ... & De Troch, M. (2023). Functional characterization reveals a diverse array of metazoan fatty acid biosynthesis genes. *Molecular Ecology*, 32(4), 970-982.
- Busch, K.E.T., Falk-Petersen, I.-B., Peruzzi, S., Rist, N.A. and Hamre, K. (2010) Natural zooplankton as larval feed in intensive rearing systems for juvenile production of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*. 41, 1727-1740.
- Cahu, C.L. and Zambonino-Infante, J.L. (2001) Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*. 200, 161-180.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L. and Barbosa, V. (2003) Effect of dietary phospholipid level and phospholipid:neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *British Journal of Nutrition*. 90, 1, 21-28.
- Castro, J., Pino-Querido, A., Hermida, M., Chavarrías, D., Romero, R., García-Cortés, L.A., Toro, M.A. and Martínez, P. (2008) Heritability of skeleton abnormalities (lordosis, lack of operculum) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) supported by microsatellite family data. *Aquaculture*. 279, 18-22.
- Conceição, L.E.C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., Dinis, M.T. (2010) Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*. 41, 613-640.
- Dhont, J., Dierekens, K., Stottrup, J., Van Stappen, G., Wille, M., Sorgeloos, P. (2013) Rotifers, *Artemia* and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Allan, G., and Burnell, G., Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Woodhead Publishing, 157-202.
- Evjemo, J.O., Reitan, K.I. and Olsen, Y. (2003) Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*. 227, 191-210.
- FAO (2020) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in Action*, Rome.
- FEAP (2021) *FEAP European Aquaculture Production Report 2014-2019*.
- Fernández, I., Hontoria, F., Ortiz-Delgado, J.B., Kotzamanis, Y., Estévez, A., Zambonino-Infante, J.L. and Gisbert, E. (2008) Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*. 283, 102-115.

Fernández-Díaz, C. and Yúfera, M. (1997) Detecting growth in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae fed microcapsules. *Aquaculture*. 153, 93-102.

Georgakopoulou, E., Katharios, P., Divanach, P. and Koumoundouros, G. (2010) Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture*. 308, 13-19.

Gisbert, E., Villeneuve, L. and Zambonino-Infante, J.L. (2005) Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long-chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* larval development. *Lipids*. 40, 609.

Haga, Y., Du, S.-J., Satoh, S., Kotani, T., Fushimi, H. and Takeuchi, T. (2011) Analysis of the mechanism of skeletal deformity in fish larvae using a vitamin A-induced bone deformity model. *Aquaculture*. 315, 26-33.

Hamre, K., Srivastava, A., Rønnestad, I., Mangor-Jensen, A. and Stoss, J. (2008) Several micronutrients in the rotifer *Brachionus* sp. may not fulfil the nutritional requirements of marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*. 14, 51-60.

Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L.E.C. and Izquierdo, M. (2013) Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture*. 5 (1), 26-58.

Hashimoto, K., Yoshizawa, A. C., Okuda, S., Kuma, K., Goto, S., & Kanehisa, M. (2008). The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes. *Journal of lipid research*, 49(1), 183-191.

Imsland, A.K., Foss, A., Koedijk, R., Folkvord, A., Stefansson, S.O. and Jonassen, T.M. (2006) Short- and long-term differences in growth, feed conversion efficiency and deformities in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) started on rotifers or zooplankton. *Aquaculture Research*. 37, 1015-1027.

Kabeya, N., Ogino, M., Ushio, H., Haga, Y., Satoh, S., Navarro, J. C., & Monroig, Ó. (2021). A complete enzymatic capacity for biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22: 6n-3) exists in the marine Harpacticoida copepod *Tigriopus californicus*. *Open biology*, 11(4), 200402.

Kjørsvik, E., Olsen, C., Wold, P.-A., Hoehne-Reitan, K., Cahu, C.L., Rainuzzo, J., Olsen, A.I., Øie, G. and Olsen, Y. (2009) Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids on skeletal development and fatty acid composition in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 294, 246-255.

Koedijk, R.M., Folkvord, A., Foss, A., Pittman, K., Stefansson, S.O., Handeland, S. and Imsland, A.K. (2010) The influence of first-feeding diet on the Atlantic cod *Gadus morhua* phenotype: survival, development and long-term consequences for growth. *Journal of Fish Biology*. 77, 1-19.

Kousoulaki, K., Grøtan, E., Kortner, T.M., Berge, G.M., Haustveit, G., Krogdahl, Å. and Lein, I. (2021) Technical feed quality influences health, digestion patterns, body mineralization and bone development in farming of the stomachless cleaner fish ballan wrasse (*Labrus bergylta*). *Animal Feed Science and Technology*. 274, 114830.

Magouz, F. I., Essa, M. A., Matter, M., Tageldein Mansour, A., Alkafafy, M., & Ashour, M. (2021). Population Dynamics, Fecundity and Fatty Acid Composition of *Oithona nana* (Cyclopoida, Copepoda), Fed on Different Diets. *Animals*, 11(5), 1188.

- Monroig, Ó., & Kabeya, N. (2018). Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review. *Fisheries Science*, 84, 911-928.
- Monroig, Ó., Shu-Chien, A. C., Kabeya, N., Tocher, D. R., & Castro, L. F. C. (2022). Desaturases and elongases involved in long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic animals: From genes to functions. *Progress in lipid research*, 86, 101157.
- Nielsen, B. L. H., Gøtterup, L., Jørgensen, T. S., Hansen, B. W., Hansen, L. H., Mortensen, J., & Jepsen, P. M. (2019). n-3 PUFA biosynthesis by the copepod *Apocyclops royi* documented using fatty acid profile analysis and gene expression analysis. *Biology Open*, 8(2), bio038331.
- Rønnestad, I., Yúfera, M., Ueberschär, B., Ribeiro, L., Sæle, Ø., Boglione, C. (2013) Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Reviews in Aquaculture*. 5 (1), 59-98.
- Salem, A.Md., Castanho, S., Couto, A., Candeias-Mendes, A., Silva, A., Gamboa, M., Pousão-Ferreira, P. and Ribeiro, L. (2021) How does weaning anticipation affect gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae digestive capacity, growth and survival?. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*. 25(5), 865-879.
- Shields, R.J., Gordon Bell, J., Luizi, F.S., Gara, B., Bromage, N.R. and Sargent, J.R. (1999) Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. *The Journal of Nutrition*. 129 (6), 1186-1194.
- Støttrup, J.G. (2000) The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture Research*. 31, 703-711.
- Støttrup, J.G., Richardson, K., Kirkegaard, E. and Pihl, N.J. (1986) The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture*. 52, 2, 87-96.
- Wang, K., Li, K., Shao, J., Hu, W., Li, M., Yang, W., Tian, J., & Lin, Q. (2017). Yeast and Corn Flour Supplement to Enhance Large-scale Culture Efficiency of Marine Copepod *Tisbe furcata*, a Potential Live Food for Fish Larvae. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 69(20892).
- Wold, P.-A., Hoehne-Reitan, K., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Rainuzzo, J. and Kjørsvik, E. (2009) Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids: effects on gut, liver and pancreas histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture Nutrition*. 15, 73-84.
- Zheng, X., Leaver, M. J., & Tocher, D. R. (2009). Long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in fish: Comparative analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)  $\Delta 6$  fatty acyl desaturase gene promoters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 154(3), 255-263.