Gefördert durch:

Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME

Institutsteil Bioressourcen des Fraunhofer IME

Schlussbericht des Vorhabens KMUi-BÖ04: OekoReproShrimp - Ökologische Reproduktion von Shrimps

Prof. Dr. Till F. Schäberle, Dr. Sanja Mihajlovic

031B1356B

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 031B1356B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.“

Teil I – Kurzbericht

ZE: Fraunhofer IME, Institutsteil Bioressourcen des Fraunhofer IME	**Förderkennzeichen:** 031B1356B
Vorhabenbezeichnung: KMUi-BÖ04: OekoReproShrimp	
Berichtszeitraum: 01.12.2022 bis 30.11.2025	

KMUi-BÖ04: OekoReproShrimp – Fraunhofer IME: Projektzusammenfassung

Das Projekt OekoReproShrimp wurde initiiert, um einer kritischen Versorgungslücke in der globalen Garnelenaquakultur zu begegnen: dem Fehlen kommerziell verfügbarer, EU-zertifizierter ökologischer Zuchttiere (*Broodstock*) für *Litopenaeus vannamei* und *Penaeus monodon* sowie dem Mangel an einem validierten Aufzuchtprotokoll, das den Anforderungen der einschlägigen EU-Öko-Verordnungen (EU VO 2018/848 und EU VO 2021/1165) entspricht. Dieses Defizit hat unmittelbare Konsequenzen für Kleinbauern in Asien und Südamerika, die in integrierten Garnelen-Mangroven-Aquakultursystemen (IMA) arbeiten: Trotz ökologisch nachhaltiger und kohlenstoffneutraler Produktionsweisen sind sie nicht in der Lage, EU-zertifizierte Bio-Larven zu beziehen.

Die wesentlichen Projektziele umfassten: (a) die Etablierung des ersten kommerziell verfügbaren, EU-zertifizierten ökologischen Broodstocks von *P. monodon* in Deutschland; (b) die Entwicklung und Veröffentlichung eines mit den EU-Öko-Vorschriften konformen Zuchtprotokolls; sowie (c) die Erzielung wirtschaftlich tragfähiger Larvenüberlebensraten ohne den Einsatz von Antibiotika. Zur Erreichung dieser Ziele wurden zwei komplementäre methodische Ansätze verfolgt: (i) die Entwicklung molekulardiagnostischer Werkzeuge — im Speziellen Multiplex-PCR-Assays — zur raschen und speziesspezifischen Detektion pathogener Bakterien im Aufzuchtwasser, sowie (ii) die systematische Evaluierung von Probiotika-Anwendungen zur Unterstützung der Larvengesundheit und zur Reduktion infektionsbedingter Mortalität in kritischen Metamorphosestadien.

Zum Zeitpunkt des Projektbeginns war die Verfügbarkeit molekulardiagnostischer Werkzeuge für *Vibrio* spp. begrenzt: Der fortschrittlichste publizierte Multiplex-PCR-Ansatz (mPCR) ermöglichte lediglich den Nachweis von vier *Vibrio*-Pathogenen und erforderte zudem eine vorherige DNA-Extraktion — eine erhebliche praktische Einschränkung für das Routinemonitoring in der Aquakultur. Der geplante Beitrag des Fraunhofer IME konzentrierte sich auf: (i) die Entwicklung schneller, speziesspezifischer molekulardiagnostischer Werkzeuge für pathogene *Vibrio* spp. im Garnelenaufzuchtwasser, sowie (ii) die Etablierung von Mikrobiom-Analyseworkflows zur Unterstützung der Evaluierung probiotischer Interventionen durch den Projektpartner REM (Remofarm GmbH & Co. KG).

Das Projekt wurde in enger Zusammenarbeit zwischen dem Fraunhofer IME und REM durchgeführt, wobei das experimentelle Design dynamisch an die sich verändernden operativen Rahmenbedingungen angepasst wurde; alle wesentlichen Modifikationen wurden durch den Projektträger Jülich (PTJ) formal genehmigt. Die Zielspezies wurde zu Projektbeginn von *L. vannamei* auf *P. monodon* umgestellt, was der größeren strategischen Relevanz von *P. monodon* für die anvisierten IMA-Märkte Rechnung trägt. Der geplante Aufzuchtstandort bei der Suburban Seafood GmbH in Nebelschütz wurde durch eine containerbasierte Anlage am Fraunhofer IME-BR in Gießen ersetzt, wodurch ein unmittelbarer und intensiver wissenschaftlicher Austausch und eine enge Koordination beider Teams ermöglicht wurde. Im Anschluss an die Verlagerung der REM-Einrichtung zur Europrawn Hellas S.A. in Igoumenitsa, Griechenland, unterstützte das Fraunhofer IME aktiv die Anpassung des experimentellen Designs und die Planung für den neuen operativen Kontext. Die

Projektkoordination wurde durch regelmäßige Online-Meetings fortgeführt, wobei sämtliche Sitzungen durch genehmigte Sitzungsprotokolle dokumentiert wurden. REM etablierte in der Folge eine neue Kooperation mit der Aquarium Dietzenbach GmbH in Deutschland, die eine solide Grundlage für die zukünftige Entwicklung eines ökologischen *P. monodon Broodstocks* bildet. Um den wissenschaftlichen Output innerhalb der Projektlaufzeit zu maximieren, führte das IME Feldprobennahmen bei der Damm Aquakultur GmbH & Co. KG durch, um repräsentative Wasserproben für die Methodenvalidierung zu gewinnen.

Die zentrale wissenschaftliche Leistung des Fraunhofer IME ist die Entwicklung einer neuartigen mPCR-Methode, die den simultanen Nachweis von 12 pathogenen *Vibrio*-Spezies in vier Multiplex-Assays sowie einer Einzel-PCR-Reaktion ermöglicht. Die Zielspezies umfassen: *V. alginolyticus, V. mimicus, V. parahaemolyticus, V. anguillarum, V. penaeicida, V. vulnificus, V. campbellii, V. fluvialis, V. owensii, V. nigripulchritudo, V. splendidus* und *V. harveyi*. Eine Nachweisempfindlichkeit von 0,1 ng/µl wurde für alle Zielspezies erreicht, wobei für *V. penaeicida* und *V. harveyi* sogar 0,01 ng/µl erzielt wurden. Eine methodische Schlüsselinnovation stellt die direkte Verwendung von unbehandeltem Aufzuchtwasser als PCR-Template dar, wodurch die Notwendigkeit einer vorherigen DNA-Extraktion vollständig entfällt. Dies verkürzt die Durchlaufzeit erheblich und ermöglicht den direkten Einsatz der Methode an Aquakulturstandorten — ein Fortschritt, der die entwickelte Methode von allen bisher publizierten mPCR-Ansätzen unterscheidet. Die Methode wurde erfolgreich an realen Aquakulturwasserproben validiert, die aus einem *L. vannamei*-Biofloc-System der Damm Aquakultur GmbH & Co. KG entnommen wurden. Dabei wurden fünf Zielspezies positiv detektiert. Eine umfassende Standardarbeitsanweisung (Standard Operating Procedure, SOP) für die eigenständige Durchführung der mPCR-Assays durch Personal vor Ort an der jeweiligen Aquakulturanlage wurde ausgearbeitet.

Zur Unterstützung der im Rahmen der Probiotika-Evaluierungen geplanten Mikrobiom-Analysen wurden drei DNA-Extraktionskits unter Verwendung von *L. vannamei*-Postlarven als repräsentativem Probenmaterial evaluiert. Das Kit der Firma Zymo Research erzielte die besten Gesamtergebnisse hinsichtlich DNA-Ausbeute, Stabilität und Reinheit. Vier transportkompatible Probenbehandlungsprotokolle — zwei für Larvenproben und zwei für Aufzuchtwasserproben — wurden entwickelt und validiert. Diese integrieren DNA/RNA-Stabilisatoren zur Erhaltung der Probenintegrität während des Versands vom REM-Aquakulturstandort zum IME-Labor. Alle Protokolle wurden finalisiert und dem Projektpartner REM zur Verfügung gestellt und sind für den Einsatz in zukünftigen Versuchskampagnen vollständig einsatzbereit.

Sämtliche entwickelten Werkzeuge — der mPCR-Assay, die SOP und die Probennahmeprotokolle — sind vollständig etabliert und bereit für die Validierung unter realen *P. monodon*-Aufzuchtbedingungen. Damit stellen sie einen unmittelbaren und klar definierten Ausgangspunkt für weiterführende Forschungsarbeiten dar. Ein Manuskript mit dem Arbeitstitel „Multiplex and Species-Specific PCR for Detecting Twelve Pathogenic Vibrio Species in Shrimp Aquaculture Water Without Commercial DNA Extraction " wird derzeit (Q2/2026) für eine Open-Access-Veröffentlichung finalisiert, um die globale Verfügbarkeit der entwickelten Methode ohne Zugangsbeschränkungen zu gewährleisten.

Teil II – Ausführliche Darstellung der durchgeführten Arbeiten

1. Projekthintergrund und Überblick

Das Projekt ÖkoReproShrimp wurde initiiert, um einer kritischen Versorgungslücke in der globalen Garnelenaquakultur zu begegnen: dem Fehlen kommerziell verfügbarer, EU-zertifizierter ökologischer Zuchttiere („*Broodstock*“) für *Litopenaeus vannamei* und *Penaeus monodon* sowie dem Mangel an einem validierten Aufzuchtprotokoll gemäß den EU-Öko-Verordnungen (EU VO 2018/848 und EU VO 2021/1165). Dieses Defizit hat unmittelbare Folgen für Kleinbauern in Asien und Südamerika, die in integrierten Garnelen-Mangroven-Aquakultursystemen (IMA) tätig sind und trotz ökologisch nachhaltiger sowie kohlenstoffneutraler Produktionssysteme keine EU-zertifizierten Bio-Larven beziehen können.

Die wesentlichen Projektziele umfassten: (a) die Etablierung des ersten kommerziell verfügbaren, EU-zertifizierten ökologischen Broodstocks von *L. vannamei* in Deutschland; (b) die Entwicklung und Veröffentlichung eines EU-konformen Zuchtprotokolls; sowie (c) die Erzielung wirtschaftlich tragfähiger Larvenüberlebensraten ohne den Einsatz von Antibiotika. Methodisch wurden zwei komplementäre Ansätze verfolgt: die Entwicklung molekulardiagnostischer Werkzeuge — im Speziellen Multiplex-PCR-Assays — zur raschen und speziesspezifischen Detektion pathogener Bakterien im Aufzuchtwasser sowie die systematische Evaluierung von Probiotika-Anwendungen zur Förderung der Larvengesundheit und zur Reduktion infektionsbedingter Mortalität in kritischen Metamorphosestadien.

Das Projekt unterlag mehreren wesentlichen Änderungen, die allesamt durch den Projektträger (PTJ) formal genehmigt wurden. Von besonderer Bedeutung ist die Umstellung der Zielspezies von *L. vannamei* auf *Penaeus monodon* zu Beginn des Projekts. Der ursprünglich geplante Aufzuchtstandort bei der Suburban Seafood GmbH in Nebelschütz wurde zunächst durch eine containerbasierte Anlage am Fraunhofer IME-BR in Gießen ersetzt und anschließend zur Europrawn Hellas S.A. in Igoumenitsa, Griechenland (GR-46100), verlagert. Infolge des vollständigen und irreversiblen Verlusts des *P. monodon*-Larvenbestands in Griechenland kehrte REM nach Deutschland zurück und initiierte eine Kooperation mit der Aquarium Dietzenbach GmbH, Dietzenbach (DE-63128). *P. monodon*-Eier aus dem neu etablierten ökologischen Broodstock werden jedoch erst nach dem offiziellen Projektende (November 2025) verfügbar sein.

2. Beschreibung der durchgeführten Arbeiten je Arbeitspaket (AP)

Arbeitspaket 1 – Diagnostik

AP1 umfasste zwei Komponenten: (i) die Evaluierung kommerziell erhältlicher Diagnostikprodukte und (ii) die Entwicklung eines eigenständigen Multiplex-PCR-Werkzeugs (mPCR) zum Nachweis pathogener *Vibrio*-Spezies.

Das kommerzielle Kit GenPasQ® konnte nicht beschafft werden, da es in Deutschland nicht vertrieben wird. Als Alternative wurde beschlossen, Proben zur diagnostischen Analyse mittels der multiplexierten PCR-Plattform ShrimpMultiPath an das Unternehmen Genics (Australien) zu übermitteln. Diese Plattform ermöglicht den Nachweis viraler, mykotischer und mikrobieller Pathogene. Da dieser Ansatz jedoch keine speziesspezifische Diagnostik pathogener *Vibrio*-Stämme erlaubt, wurde die Entwicklung einer maßgeschneiderten, internen mPCR-Diagnostikplattform vorgenommen.

Die Entwicklung der mPCR-Methode wurde erfolgreich abgeschlossen. Zwölf kommerziell erhältliche Referenzstämme, die bekannte pathogene *Vibrio*-Spezies mit Relevanz für die Garnelenaquakultur repräsentieren, wurden aus der DSMZ-Kultursammlung bezogen. Isolierte genomische DNA diente als Template für die Assay-Entwicklung. Speziesspezifische und degenerierte Primer wurden entweder aus der publizierten Literatur ausgewählt oder neu entworfen. Die Zielspezifität wurde zunächst *in silico* mithilfe bioinformatischer Werkzeuge evaluiert und anschließend *in vitro* per PCR experimentell überprüft. Mittels Gradienten-PCR wurden optimale *Annealing*-Temperaturen bestimmt; vier Multiplex-PCR-Reaktionen wurden auf Basis der Produktgrößendifferenzierung definiert:

- mPCR 1: *V. alginolyticus* (737 bp), *V. mimicus* (121 bp), *V. parahaemolyticus* (271 bp)
- mPCR 2: *V. anguillarum* (429 bp), *V. penaeicida* (504 bp), V. vulnificus (205 bp)
- mPCR 3: *V. campbellii (*245 bp), *V. fluvialis* (303 bp), *V. owensii* (85 bp)
- mPCR 4: *V. nigripulchritudo* (257 bp), *V. splendidus* (227 bp).

Obwohl Primer für *V. harveyi* in mPCR 1 integriert wurden, konnte das erwartete Amplikon (454 bp) unter Multiplex-Bedingungen nicht konsistent nachgewiesen werden; daher wurde für diese Spezies eine Einzel-PCR etabliert. Eine Nachweisempfindlichkeit von 0,1 ng/µl wurde für alle Zielstämme erreicht, wobei für *V. penaeicida* und *V. harveyi* sogar 0,01 ng/µl erzielt wurden.

Ein wesentlicher methodischer Fortschritt des entwickelten Assays ist die direkte Verwendung unbehandelter Wasserproben als PCR-Templates, wodurch eine vorherige DNA-Extraktion entfällt. Dies verkürzt die Durchlaufzeit von der Probennahme bis zum Ergebnis erheblich und erleichtert den Einsatz direkt an Aquakulturstandorten. Dieser Aspekt unterscheidet die entwickelte Methode von allen bisher publizierten mPCR-Ansätzen, die auf extrahierter DNA als Template beruhen.

Da *P. monodon*-Proben nicht verfügbar waren, führten IME-Wissenschaftlerinnen und -Wissenschaftler eine Feldkampagne bei der Damm Aquakultur GmbH & Co. KG durch, um Wasserproben aus einem *L. vannamei*-Biofloc-System als Ersatzmaterial für die Methodenvalidierung zu entnehmen. Die entwickelten mPCR-Reaktionen wurden erfolgreich auf diese Proben angewendet; dabei wurden *V. harveyi, V. mimicus, V. parahaemolyticus, V. vulnificus* und *V. nigripulchritudo* in den mPCR-Reaktionen 1, 2 und 4 detektiert.

Ursprünglich war geplant, das Diagnostikwerkzeug auf 180 Wasserproben aus einem Testaufzuchtlauf in Griechenland (Juni/Juli 2024, 18 Tanks) sowie auf 1.170 Wasserproben aus einem 21-tägigen Probiotika-Experiment (AP2) anzuwenden. Keine dieser Kampagnen konnte durchgeführt werden, da die gesamte *P. monodon*-Larvenpopulation nicht überlebte. Ursprünglich war die Durchführung der mPCR-Diagnostik durch REM vorgesehen; nach der Umstrukturierung des Projekts und in Abstimmung mit dem PTJ wurde diese Aufgabe auf das Fraunhofer IME übertragen. Das IME erstellte daraufhin eine umfassende SOP für die eigenständige Durchführung der mPCR-Assays, einschließlich einer vollständigen Liste der erforderlichen Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien. Parallel dazu entwickelte das IME standardisierte Probennahmeprotokolle für Wasser- und Larvenproben, die an REM in Griechenland weitergeleitet wurden, um eine sachgemäße Probenvorbereitung und den Versand zum IME sicherzustellen. Die Validierung dieser Protokolle und der SOP unter Feldbedingungen in Aquakulturanlagen steht noch aus (aufgrund des Fehlens von Wasser- und Larvenproben).

Arbeitspaket 2 – Probiotika

Dieses Arbeitspaket sah ursprünglich die Testung von Probiotika vor. Um die von REM in der Larvenaufzucht untersuchten positiven Effekte von Probiotika zu evaluieren, sollte das IME Mikrobiomanalysen durchführen. Hierfür wurden drei verschiedene Kits (ein hauseigenes Kit, Zymo Research und VWR) hinsichtlich der Qualität der extrahierten Gesamt-DNA geprüft. Die besten Ergebnisse hinsichtlich Gesamtausbeute, DNA-Stabilität und Reinheit (260/280-nm-Verhältnis) wurden mit dem DNA-Kit von Zymo Research erzielt. Diese Tests wurden an *Litopenaeus vannamei* in der Postlarvenphase (PL) durchgeführt, die aufgrund der Nichtverfügbarkeit von *P. monodon*-Larven ersatzweise von der Damm **Aquakultur GmbH** & Co. KG bezogen wurden.

Um die Probenintegrität während des Transports vom Probennahmestandort in Igoumenitsa, Griechenland, zum Labor in Gießen sicherzustellen, wurden DNA/RNA-Stabilisatoren (Zymo Research) in den Probennahme-Workflow integriert. Es wurden vier Probenbehandlungsprotokolle entwickelt und teilweise validiert — zwei für Larvenproben und zwei für Aufzuchtwasserproben — unter Verwendung von *L. vannamei*-Postlarven (PL; 5 Larven pro Probe) und Wasserproben aus einem *L. vannamei*-Biofloc-System als repräsentativem Ersatzmaterial.

Für Larvenproben wurden zwei Protokolle evaluiert:

- Protokoll A: Zentrifugation, dreistufiges Waschen, DNA/RNA-Shield-Stabilisierung
- Protokoll B: Zentrifugation, dreistufiges Waschen, DNA/RNA-Shield-Stabilisierung mit anschließender Homogenisierung

Für Aufzuchtwasserproben wurden folgende Protokolle angewendet:

- Protokoll C: Zentrifugation, dreistufiges Waschen, DNA/RNA-Shield-Stabilisierung
- Protokoll D: Zentrifugation, dreistufiges Waschen, DNA/RNA-Shield-Stabilisierung mit anschließender Homogenisierung

Die aus Proben aller vier Protokolle isolierte DNA wies eine stabile Qualität auf, was die Eignung dieser Ansätze für den standortübergreifenden Probentransport bestätigt. Die finalisierten Probennahmeprotokolle wurden gemeinsam mit detaillierten Anweisungen zur Probenvorbereitung vor dem Transport sowie einer vollständigen Liste der erforderlichen Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien zusammengestellt und dem Projektpartner REM zur Verfügung gestellt.

Da sämtliche *P. monodon*-Larven in den Aufzuchtexperimenten nicht überlebten, wurden dem IME weder Aufzuchtwasserproben noch Larven aus verschiedenen Entwicklungsstadien übermittelt. Infolgedessen konnte keine der geplanten Diagnostikmaßnahmen innerhalb der Projektlaufzeit durchgeführt werden. Die Validierung sowohl des entwickelten Probenbehandlungsverfahrens als auch des Probennahmeprotokolls ist zum Zeitpunkt des Projektabschlusses noch ausstehend.

Arbeitspaket 3 – Mikrobiom und Immunstatus

Die Mikrobiomanalyse von mehr als 150 Proben aus verschiedenen Entwicklungsstadien der *P. monodon*-Larven wurde nicht durchgeführt, da keine Proben von REM eingingen. Nach Abstimmung mit dem PTJ verteilten IME und REM die Aufgaben innerhalb dieses Arbeitspakets neu. Die Untersuchung des Immunstatus wurde deprioritisiert; stattdessen wurde vereinbart, den Fokus auf die ersten 10 Tage nach dem Larvenschlupf zu legen. Entsprechend war für 2024 der Einsatz der entwickelten mPCR zur Diagnostik pathogener *Vibrio* spp. geplant. In Griechenland wurden jedoch keine Proben für diesen Zweck gesammelt.

Wie im Koordinatorbericht zu AP3 dargelegt, erzielte REM am Standort GR-46100 unter Einsatz von Peressigsäure (PES) eine quantitative Kontrolle der mikrobiellen Kontamination in den Larvenbecken, was durch Wasserprobenanalysen bestätigt wurde. Angesichts dieser Ergebnisse wurde die Mikrobiomanalyse weiter deprioritisiert. Ergänzende Experimente zur Abbaukinetik von PES mit dem Ziel einer Stabilisierung unterhalb von 10^3 KBE/ml sollen von REM am Standort DE-63128 durchgeführt werden. REM wird die Themen Mikrobiomanalyse und Immunstatus folglich nicht weiterverfolgen.

Arbeitspaket 4 – Bio-Zertifizierung

Eine Masterarbeit wurde abgeschlossen, die eine umfassende und detaillierte Dokumentation aller in AP1 erzielten Ergebnisse liefert, einschließlich des vollständigen Entwicklungs- und Validierungsworkflows für das mPCR-Diagnostikwerkzeug. Das Manuskript mit dem Arbeitstitel „Multiplex and Species-Specific PCR for Detecting Twelve Pathogenic Vibrio Species in Shrimp Aquaculture Water Without Commercial DNA Extraction" soll in Q2/2026 zur Veröffentlichung bei einer Open-Access-Zeitschrift eingereicht werden.

Arbeitspaket 5 – Generierter Prototyp (Bio-Broodstock)

Für dieses Arbeitspaket war kein Beitrag seitens des Fraunhofer IME erforderlich.

Arbeitspaket 6 – Projektmanagement

Während der gesamten Projektlaufzeit wurden regelmäßige Treffen abgehalten, entweder als Videokonferenzen oder in Präsenz. Die zeitweise Ansiedlung der REM-Einrichtung in Gießen ermöglichte einen besonders direkten und intensiven Austausch zwischen den Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern beider Projektpartner. Nach der Verlagerung der Einrichtung nach Griechenland und dem Ausscheiden des REM-Wissenschaftlers aus dem Projekt wurden alle nachfolgenden Besprechungen ausschließlich im Online-Format abgehalten. Sowohl die Treffen als auch der E-Mail-Verkehr dienen als Plattformen für den regelmäßigen Austausch von Daten und Ergebnissen. Alle Besprechungen werden durch ausführliche Protokolle dokumentiert, die von Mitgliedern beider Projektteams geprüft und genehmigt werden.

3. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personal: Eine wissenschaftliche Mitarbeiterin (Entgeltgruppe E13) mit einem Stellenanteil von 33 % wurde wie geplant auf dem Projekt beschäftigt.

Verbrauchsmittel: Verbrauchsmittel wurden wie geplant eingesetzt.

4. Notwendigkeit und Angemessenheit der durchgeführten Arbeiten

Die vom Fraunhofer IME durchgeführten Arbeiten waren im Kontext der Projektziele notwendig und angemessen. Die Entwicklung eines speziesspezifischen, extraktionsfreien mPCR-Diagnostikwerkzeugs für 12 pathogene *Vibrio*-Spezies adressiert unmittelbar eine dokumentierte Lücke in der Biosicherheitsdiagnostik der Aquakultur. Die entwickelte Methode übertrifft den aktuellen Stand der Technik, da der einzig vergleichbare publizierte mPCR-Ansatz lediglich fünf Primerpaare für den

Nachweis von vier *Vibrio*-Spezies integriert und extrahierte DNA als Template erfordert. Die Entwicklung von Probennahmeprotokollen und SOPs war unerlässlich, um den geplanten standortübergreifenden Diagnostikworkflow zwischen Griechenland und Deutschland zu ermöglichen. Die Umverteilung von Personalstunden aus AP3 auf AP1, AP2 und AP4 stellte eine rationale Reaktion auf die projektbedingten Herausforderungen dar und gewährleistete, dass die verfügbaren Ressourcen auf Arbeitsergebnisse gelenkt wurden, die angesichts der fehlenden *P. monodon*-Proben realistischerweise erzielt werden konnten.

5. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Das im Rahmen dieses Projekts entwickelte mPCR-Diagnostikwerkzeug ist unmittelbar in der Biosicherheitsüberwachung der Aquakultur anwendbar. Seine wesentlichen Vorteile — der simultane Nachweis von 12 pathogenen *Vibrio*-Spezies, die fehlende Notwendigkeit einer DNA-Extraktion sowie die kurze Durchlaufzeit — machen es für den Routineeinsatz in kommerziellen Garnelen-Brut und -Zuchtanlagen und Forschungseinrichtungen geeignet. Die Methode ist bei beiden Hauptspezies, sowohl auf *L. vannamei*- als auch auf *P. monodon*-Produktionssysteme, anwendbar. Eine erfolgreiche Anwendung auf Wasserproben aus einer *L. vannamei*-Biofloc-Anlage wurde demonstriert.

Es wurden keine Schutzrechte angemeldet. Alle Ergebnisse werden durch eine Open-Access-Veröffentlichung frei zugänglich gemacht, wodurch eine unmittelbare Übernahme durch die wissenschaftliche Gemeinschaft, diagnostische Labore und die Aquakulturindustrie ermöglicht wird. Kommerzielle Einrichtungen wie Genics können das veröffentlichte Protokoll eigenständig evaluieren und in ihre bestehenden Diagnostikdienstleistungsportfolios integrieren.

Konkrete Planungen für die nahe Zukunft umfassen: (i) die Einreichung und Veröffentlichung des geplanten Manuskripts (prognostiziert bis Ende Mai 2026); (ii) die Validierung der entwickelten Probennahmeprotokolle und der SOP unter Verwendung von *P. monodon*-Proben, sofern geeignetes Material in zukünftigen Projekten verfügbar wird; sowie (iii) das potenzielle Angebot mPCR-basierter Diagnostikdienstleistungen durch das Fraunhofer IME auf Auftragsforschungsbasis.

6. Relevante wissenschaftliche Fortschritte an anderen Einrichtungen

Während der Projektlaufzeit setzte die Weiterentwicklung der Molekulardiagnostik in der Aquakultur fort. LAMP-basierte Assays wurden zunehmend als Alternativen zur PCR für den Vor-Ort-Nachweis von Pathogenen beschrieben und bieten den Vorteil der isothermen Amplifikation ohne den Bedarf an Thermocycler-Geräten. Darüber hinaus haben metagenomische Ansätze zur Mikrobiom-Profilierung von Garnelenlarven an Bedeutung gewonnen und liefern eine höhere Auflösung der mikrobiellen Gemeinschaftsdynamik als zielgerichtete PCR-basierte Methoden. Die fortlaufende Entwicklung kommerzieller Multiplex-Plattformen, wie etwa jener des Unternehmens Genics, unterstreicht die wachsende industrielle Nachfrage nach schnellen, Multipathogen-Diagnostikwerkzeugen — und bestätigt damit die Relevanz und Aktualität des im Rahmen dieses Projekts verfolgten Ansatzes.

7. Veröffentlichungen

Abgeschlossen: Masterarbeit zur Entwicklung des Multiplex-PCR-Diagnostikwerkzeugs für den Nachweis pathogener Vibrio spp. in der Garnelenaquakultur (umfassende Dokumentation der AP1-Ergebnisse).

Geplant: Einreichung des Manuskripts mit dem Arbeitstitel „Multiplex and Species-Specific PCR for Detecting Twelve Pathogenic Vibrio Species in Shrimp Aquaculture Water Without Commercial DNA Extraction" bei einer Open-Access-Zeitschrift, geplant bis Ende Mai 2026.