Blaue Bioökonomie BioFiA

Forschungsinstitut für Nutztierbiologie

GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium für Bildung und Forschung

# Abschlussbericht

## Innovationsräume Bioökonomie –Bioökonomie an Marinen Standorten

## Teilprojekt 1 – Umsetzungsphase

## **Bio**indikatoren für die Evaluierung der Haltung, Gesundheit und Produktqualität von **Fi**schen in differenten **A**quakultursystemen (*Bio*FiA)

| | |
|---|---|
| **Zuwendungsempfänger:** | **Forschungsinstitut für Nutztierbiologie (FBN)<br>Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf** |
| **Förderkennzeichen (FKZ):** | 031B0915E1 |
| **Vorhabenbezeichnung:** | Innovationsraum BaMS-BioFiA – Teilprojekt 1 |
| **Berichtzeitraum:** | 01.08.2020 bis 30.04.2024 |
| **Autor:** | Prof. Dr. Tom Goldammer |

## Verbundpartner im Gesamtprojekt BioFiA

Die Durchführung des Teilprojektes 1 erfolgte im Rahmen des Verbundprojektes BioFiA in enger Kooperation mit verschiedenen institutionellen und wirtschaftlichen Einrichtungen. In das Teilprojekt 1 integriert war die Koordination des Verbundprojektes BioFiA durch das FBN (Sprecher: Prof. Dr. Tom Goldammer).

| Teilprojekt | FKZ | Kürzel | Einrichtung |
|---|---|---|---|
| **TP 1** | **031B0915E1** | **FBN** | **Forschungsinstitut für Nutztierbiologie (FBN), Arbeitsgruppe Fischgenetik** |
| **TP 2** | 031B0915E2 | CAU | Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Tierzucht und Tierhaltung |
| **TP 3** | 031B0915E9 | UHH | Universität Hamburg, Abteilung für Mikrobiologie & Biotechnologie |
| **TP 4** | 031B0915E0 | UHR | Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Aquakultur- und Sea-Ranching |
| **TP 5** | 031B0915E5 | MRI | Max-Rubner-Institut (MRI), Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel |
| **TP 6** | 031B0915E6 | MIG | Microganic GmbH |
| **TP 7** | 031B0915E7 | MOF | MonitorFish GmbH |
| **TP 8** | 031B0915E8 | IMT | Fraunhofer-Einrichtung für Individualisierte und Zellbasierte Medizintechnik (IMTE), Aquakultur und Aquatische Ressourcen |

Forschungsinstitut für Nutztierbiologie · CAU Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät · UHH Universität Hamburg · MRI Max Rubner-Institut · Universität Rostock · Fraunhofer IMTE · microganic · MONITORFISH

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 3

Tabellen und Abbildungen 4

Einführende Zusammenfassung und Aufgabenstellung 5

Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen 5

Wissenschaftlich-technische Arbeitsziele des Vorhabens 6

FBN spezifische Zielstellungen in BaMS-BioFiA-TP1 7

Ablauf des Vorhabens 8

- Arbeitspakete 8
- Zeitlicher Ablauf des BaMS-BioFiA-Teilprojektes 1 8
- Technischer Ablauf der Versuchskampagnen 9

Ergebnisse und deren Bewertung innerhalb des Vorhabens 10

1. Versuchskampagne 10
2. Versuchskampagne 12
3. Versuchskampagne 16

Molekulare Prüf- und Monitoringmechanismen für das Fischwohl 20

Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit 28

- Wissenschaftskommunikation – Publikationen, Öffentlichkeit 28

Allgemeine Angaben zur Verwendung der Zuwendung 30

- Personal im BaMS-BioFiA TP1 30
- Sachmittel im BaMS-BioFiA TP1 30

Danksagung 30

Anhang 31

- Im Bericht verwendete Literatur 31

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B0915E1 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.“

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| ALT | Alanin-Aminotransferase |
| AP | *Arthrospira platensis* 8% täglich |
| APC | APC, WNT signaling pathway regulator |
| *arg2* | Arginase-2 |
| AST | Aspartat-Aminotransferase |
| *b2m* | Beta-2 microglobulin |
| BaMS | Bioökonomie an Marinen Standorten |
| BioFiA | Bioindikatoren für die Evaluierung der Haltung, Gesundheit und Produktqualität von Fischen in differenten Aquakultursystemen |
| BW | Brackwasser |
| *camp* | Cathelicidin antimicrobial peptide |
| *cat* | Katalase |
| *c1ql2* | C1q-like adipose protein |
| *c4b* | Complement component C4 |
| *ccl4* | Chemokin C-C-Motiv-Liganden 4 |
| CD | Control diet, Kontrollfutter |
| *cd4* | Cluster of Differentiation 4 |
| *cd28* | Cluster of differentiation 28 |
| *cebpb* | CCAAT/enhancer binding protein beta |
| CF | Fulton's condition factor |
| *clra* | C type lectin receptor A |
| CV2 | *Chlorella vulgaris* 2% täglich |
| CV14 | *Chlorella vulgaris* 14% täglich |
| CV14w | *Chlorella vulgaris* 14% einmal wöchentlich |
| CVB | *Chlorella vulgaris* gebrochen 8% täglich) |
| CVI | *Chlorella vulgaris* intakt 8% täglich |
| *cxcl8a* | Chemokine (C-X-C motif) ligand 8a |
| DFI | Tägliche Futteraufnahme |
| drtp1 | Differentially regulated trout protein 1 |
| FBN | Forschungsinstitut für Nutztierbiologie |
| fcgr1a | Fc gamma receptor Ia |
| FCR | Feed conversion ratio |
| *gpx* | Glutathione peroxidase |
| h | Stunden |
| *hamp** | Hepcidin |
| *hspa1a* | Heat shock 70 kDa protein 1A |
| *hspa5* | Heat shock protein family A (Hsp70) member 5 |
| *ier2-2* | Immediate early response 2-2 |
| *ifit5* | Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 5 |
| *ifn2a* | Interferon alpha |
| *ikba* | NF-κB-Inhibitor α |
| *il10rb* | Interleukin-10 receptor subunit beta-like |
| *il18* | Interleukin 18 |
| *il1b* | Interleukin-1 beta |
| *il1r2* | IL-1 receptor type II |
| IMTE | Individualisierte u. Zellbasierte Medizintechnik |
| *isg15* | Interferon-stimulated gene 15 |
| *lao1* | L-amino acid oxidase 1 |
| *lyz2* | Lysozyme C II precursor |
| *marco* | Macrophage receptor |
| Mpo | Myeloperoxidase |
| MS | Meilenstein |
| NF-κB | Nuclear factor kappa B |
| *nfkbia* | NFKB inhibitor alpha |
| PAA | Peressigsäure |
| PER | Protein efficiency ratio, Proteineffizienzverhältnis |
| PRE | Protein retention efficiency, Proteineinlagerungseffizienz |
| SGR | Specific growth rate, Spezifische Wachstumsrate |
| SL | *Schizochytrium limacinum* 8% täglich |

| | |
|---|---|
| *sod1* | Superoxide dismutase 1 |
| SWT | Seawater transfer Meerwassertransfer; |
| T-Zellen | T-Lymphozyten (Thymus) |
| TC | *Tetraselmis chuii* 8% täglich |
| Th1 | T-Helferzellen, $T_H1$-Lymphozyten |
| *tnfrsf14* | TNF receptor superfamily member 14 |
| wks | Weeks, Wochen |

## Tabellen und Abbildungen

Abbildung 1 Graphische Darstellung aller Versuchskampagnen im Projekt BioFiA.

Abbildung 2 Rezirkulierendes Aquakultursystem (links) für die erste Versuchskampgne (ein Strang, ein Biofilter, 10 Becken, 300l/Becken, Fischart: Atlantischer Lachs).

Abbildung 3 Versuchsdesign. Im Beispiel sind Mikroalgendiäten dargestellt.

Abbildung 4 Vorbereitung der Beprobung von Fischen in Versuchskampagne 1.

Abbildung 5 Heatmap der Expression von 45 Genen in 5 Geweben von Atlantischen Lachsen zu verschiedenen Zeitpunkten der ersten Versuchskampagne.

Abbildung 6 Vereinfachte Darstellung des Versuchsansatzes in Versuchskampagne 2.

Abbildung 7 Heatmap der Expression von 45 Schlüsselgenen mit Funktion in verschiedenen immunologischen Signalkaskaden in der Kopfniere nach Mikroalgendiät.

Abbildung 8 Heatmap der Expression von 45 Schlüsselgenen mit Funktion in verschiedenen immunologischen Signalkaskaden in der Kopfniere nach Mikroalgendiät und Umsetzung der Fische von Brackwasser (12‰) in Meerwasser (32‰).

Abbildung 9 Tägliche Futteraufnahme der Lachse nach verschiedenen Mikroalgendiäten und Umsetzung der Fische von Brackwasser (12‰) in Meerwasser (32‰).

Abbildung 10 Impressionen der Norwegen-Exkursion von Projektmitarbeiterinnen der Projekte BioFiA und SensoFiA.

Abbildung 11 Hierarchische Gruppierung von log2-Fold-Änderungen von immun- und stressregulierten Genen in der Kopfniere und den Kiemen von Atlantischem Lachs , der acht Wochen lang mit C. vulgaris-angereicherten Futtermitteln gefüttert wurde, nach Exposition gegenüber oxidativem Stress.

Tabelle 1 Signifikant betroffene Ganzkörperindikatoren.

Tabelle 2 Signifikant beeinflusste Indikatoren für die Muskelzusammensetzung.

Tabelle 3 Physiologische Indikatoren, die signifikant betroffen sind.

Tabelle 4 Organ-Proteinindikatoren, die signifikant betroffen sind.

Tabelle 5 Genbasierte Indikatoren, die maßgeblich betroffen sind.

## Einführende Zusammenfassung und Aufgabenstellung

Optimale Haltungsbedingungen, gesunde Tiere und innovative Rohstoffe sind Voraussetzungen für die nachhaltige Aquakultur tierischer Organismen, die Erzeugung von Qualitätsprodukten und vorteilhaften Absatz. Obwohl jedoch Fische aus Sicht des Menschen in Aquakultur erfolgreich aufwachsen, ist das Wissen zum Tierwohl selbst rudimentär und in Folge dessen der Produktionserfolg vermindert. Mit integrierten Monitoringsystemen lassen sich Stress, Gesundheit und Tierwohl aquatischer Organismen in verschiedenen Abschnitten der Produktion vom Schlupf bis zum Erreichen des Erntegewichtes der Tiere messen, Haltungsbedingungen und Aquakulturanlagen zertifizieren und somit Fischproduktionsverfahren bis hin zum Schlachtprozess optimieren. Das BaMS-BioFiA-Projekt repräsentiert einen ganzheitlichen Ansatz zur Analyse des Tierwohls des Atlantischen Lachses durch lachsspezifische molekulare Indikatoren auf Genebene *(Rebl et al., 2020),* Stresshormonen *(Seibel et al., 2021)* und KI-basierten Messtechnologien, die in der Summe eine sehr genaue Bewertung von Stress und Gesundheit der Salmoniden in verschiedenen Aufzuchtphasen ermöglichen. Die Analysen sollen Basisdaten liefern zur Auswirkung von Futterzusätzen über verschiedene Mikroalgen auf das Wohlbefinden der Tiere und die Produktqualität der Fische als menschliche Nahrung unter dem Einfluss von Stressoren wie einer Änderung des Salzgehaltes von 12‰ auf 32‰ oder nach einer üblichen Desinfektion des Haltungswassers mit Peressigsäure *(Michl et al, 2019; Microganic GmbH, Molkentin et al., 2015; Muilekom et al., 2024; Müller et al., 2023, 2024)*. Die Forschung wird durch parasitologische und bakteriologische Analysen aller beprobten Fische ergänzt, um die Validierung neuer Biomarker und die Aussagekraft der erzielten Ergebnisse zu verbessern *(Unger & Palm, 2017*). Ebenso erfolgt der Nachweis mikrobieller Muster und ihrer Nitrifikationseffizienz in Biofiltern der genutzten Kreislaufsysteme *(Hüpeden et al., 2020)*. Das Teilprojekt des FBN fokussiert insbesondere auf Genexpressionsanalysen zur Entwicklung von Bioindikatoren und einfachen Biochip-basierten Diagnoseverfahren für die Prüfung des Stressstatus und der Gesundheit von Fischen u.a. in Kreislaufanlage-Systemen. Die Hauptaufgaben des FBN im Projekt bestanden in der zellsystemspezifischen Prüfung und Validierung molekularer, zellulärer u. ökophysiologischer Stressindikatoren, der Bestimmung von Transkriptom- und Genexpressionsprofilen, der genexpressiven Validierung entwickelter Lachszelllinien in Kooperation mit dem Schwesterprojekt SensoFiA, der Bereitstellung von Prüf- und Montoringmechanismen für das Fischwohl sowie dem intensiven und schnellen Transfer neuer Erkenntnisse in den BaMS-Innovationsraum, zu den Praxispartnern, der Öffentlichkeit und in der Einbindung von Erkenntnissen in die universitäre Lehre.

## Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen

Ein Schwerpunkt im Rahmen von BaMS besteht in der Optimierung des Tierwohls bei gleichzeitiger Verbesserung der Leistungsfähigkeit und Produktqualität von Fischen in teilweise rezirkulierenden Kreislaufanlagen (KLA), einer in Deutschland und Europa weit verbreiteten Produktionstechnik für die Aquakultur von Salmoniden. Das beantragte Vorhaben befasst sich mit der Entwicklung von Werkzeugen, Produkten und Methoden zum direkten Monitoring der Gesundheit und der Stressantwort von Fischen in Aquakultur. Im Mittelpunkt steht die Forschung zur Biologie, der Gesundheit und des Stressverhaltens von Fischen in Aquakultur. Über eine Verbesserung des Wohlbefindens der Fische, basierend auf neuen validen Stressnachweisverfahren in KLA, sind massive Fortschritte in der Produktionsleistung und Produktqualität möglich. Das Vorhaben erbringt weiterhin Beiträge zur optimierten Produktion und nachhaltigen Verwertung aquatischer Biomasse im BaMS-Raum. Die

tiergerechte Fischproduktion unterstützt die Optimierung der Fischverarbeitung. Gemeinsam mit dem Einsatz neuer Rohstoffe, wie Mikroalgen, wird eine nachhaltige Futtermittel-, Fisch- und Lebensmittelproduktion gewährleistet. Die Analyse der optimalen Tierhaltung, der Einsatz innovativer Futtermittel sowie insbesondere die Identifizierung hoch diverser Mikroorganismengemeinschaften in KLA-Filtersystemen mit optimaler Nitrifizierungsrate reduzieren das Risiko der Bioakkumulation von Schadstoffen in intensiver Fischproduktion.
Tierwohl findet eine breite gesellschaftliche Akzeptanz und hat für den Endverbraucher zunehmend höhere Relevanz. Gerade die intensive Produktion des Lebensmittels Fisch in KLA muss daher auf allen Prozessebenen bis hin zur Schlachtung ständig optimiert werden, um eine sichere, zulassungsfähige und rechtlich einwandfreie Produktion zu gewährleisten. Umfassendes innovatives Biomonitoring trägt dazu bei. Optimale Tierhaltung in KLA bewirkt auch eine Verbesserung leistungsbezogener Parameter. Optimierte Fütterungsquotienten bewirken eine Verkürzung der Abwachszeit von Fischen und verringern gemeinsam mit geeigneten Mikroorganismengemeinschaften mit optimaler Nitrifizierungsrate die Last an nährstoffhaltigen Abwässern. Das beantragte Vorhaben BioFiA wird mit seinen spezifischen Unterprojekten ganz konkret zu einzelnen Aspekten der hier angesprochenen förderpolitischen Ziele innerhalb des Innovationsraumes BaMS beitragen.

## Wissenschaftlich-technische Arbeitsziele des Vorhabens

BioFiA fokussiert auf die Gewinnung neuer Grundlagenerkenntnisse im Hinblick auf das Tierwohl und die Tiergesundheit, insbesondere unter differenten Haltungs- und Fütterungsbedingungen juveniler Fische. Gerade im Zusammenhang mit schwindenden Ressourcen findet diese Thematik zunehmend im globalen Maßstab Beachtung. Für die Gewährleistung der Wettbewerbsfähigkeit beteiligter deutscher Unternehmen an BioFiA kommen deshalb neueste „*State of the Art*“-Technologien in einem interdisziplinär breit gefächerten Ansatz zur Anwendung. Ein wesentliches Ziel des Vorhabens besteht in der Kalibrierung der Stressantwort von juvenilen Salmoniden unter Berücksichtigung der komplexen Haltungsumwelt einer KLA. Dazu zählt die speziesspezifische Validierung, Anpassung und Erweiterung von geeigneten molekularen und ethiologischen Indikatoren in Korrelation zu typischen Haltungsbedingungen, Biofiltersystemen und Stressoren in rezirkulierenden Aquakultursystemen, sowie nach Diätveränderung durch alternative mikroalgenbasierte Futtermittel. Zur umfassenden Absicherung der Daten aus der molekularen Stressdiagnostik finden synergistisch Untersuchungen zu den mikrobiotischen Verhältnissen und dem Einfluss von Parasiten auf Fische in Aquakultursystemen statt. Im selben Zusammenhang erfolgen im Projekt ein physikochemisches Echtzeit-Monitoring von Fischen und die Analyse mikrobieller Biogemeinschaften und deren Nitrifizierungspotentiale in verschieden belasteten Filtersystemen von KLA. Die Ergebnisse dienen der Erweiterung des Wissens über die Fischgesundheit und das Tierwohl in derartigen Produktionssystemen und zielen direkt auf die technische Weiterentwicklung und Verbesserung der Produktivität moderner KLA ab. Neben direkten Monitoringmethoden während der Fischhaltung tragen Messungen zur Produktqualität, wie etwa die Analyse wertgebender Inhaltsstoffe in Mikroalgen und Futtermitteln in Korrelation zum resultierenden Fischfleisch zur weiteren Optimierung der Fischhaltung und auch von KLA-Technologien bei. Wie angemerkt, prüft das Projekt auch alternative Futtermittel, die auf Mikroalgen basieren. Die mit Hilfe der beschriebenen umfassenden Messmethoden generierbaren Ergebnisse, gehen dabei aufgrund der ganzheitlichen Betrachtung von Fischwachstum, Tierwohl und Produktqualität, weit über übliche Futtermittelstudien an Fischen hinaus. Sämtliche Erkenntnisse des Projektes mit dem Fokus auf Tierwohl und Tiergesundheit bieten zahlreiche Anknüpfungspunkte für weitere BaMS-Partner. Insbesondere durch die enge Zusammenarbeit mit dem

Schwesterprojekt SensoFiA wird eine synergistische Verknüpfung der systemischen Ansätze von BioFiA und der in SensoFiA zu entwickelnden Biochips und Zellkultursysteme realisiert.

Zusammengefasst ergeben sich die folgenden BioFiA-spezifischen Ziele:

- Neue Fischwohlparameter
- Einzelfisch-Monitoring durch KI
- Verbesserung der Leistungsfähigkeit
- Verbesserung der Produktqualität
- Neuartige Mikroalgen-Futtermittel
- Wertsteigernde Inhaltsstoffe und Textur
- Neue Standards für RAS-Filtersysteme

## FBN spezifische Zielstellungen in BaMS-BioFiA-TP1

Spezifische Aufgabe des FBN im Projekt BioFiA ist die Entwicklung und Bereitstellung molekularer Bioindikatoren und einfacher Biochip-basierter Diagnoseverfahren für die Prüfung des Stressstatus und der Gesundheit von Fischen u.a. in KLA-Systemen.

Im Detail wurden dafür folgende Aufgaben formuliert:

- Zellsystemspezifische Prüfung und Validierung molekularer, zellulärer und ökophysiologischer Stressindikatoren
- Bestimmung von Transkriptom- und Genexpressionsprofilen
- Genexpressive Validierung entwickelter Lachszelllinien
- Bereitstellung molekularer Prüf- und Montoringmechanismen für das Fischwohl
- Transfer von Erkenntnissen in den BaMS-Innovationsraum, Praxispartner, Öffentlichkeit und in die Universitäre Lehre

Transkriptomanalysen bieten eine robuste -omikbasierte methodische Möglichkeit, Stress und Tierschutz bei Meeresfischen auf molekularer Ebene zu überwachen. Dies zeigen wissenschaftliche Studien weltweit, darunter zahlreiche FBN-Fischstressstudien, wie z.B. für Temperatur, Besatzdichte, Krankheitserreger und Parasiten als Stressoren in der Salmonidenaquakultur (z.B. *Rebl et al., 2018; Borchel et al., 2017; Korytář et al., 2017*). Die Korrelation der Genexpression einer Reihe von Schlüsselgenen mit den entsprechenden Stressoren und den jeweiligen Fischarten ist in einigen Fällen sehr gut nachgewiesen *(Rebl et al. 2018*). Darüber hinaus sind die Signalkaskaden verschiedener Stoffwechselwege für Salmoniden relativ gut bekannt und erklärt (z.B. *Nipkow et al., 2018; Rebl & Goldammer 2018*). Typischerweise sind dies Gene für Hitzeschutz und Stressreaktion, immunsystembezogene Gene und Gene mit physiologischen Referenzen. Die Genexpression unter Stress wird in der Regel zunächst ganzheitlich mittels RNA-Seq oder Microarrays bestimmt, gefolgt von kleineren skalierten quantitativen Echtzeit-PCR-Ansätzen mit Multiplex-Biochips für rekrutierte Kandidaten-Gensätze (z.B. bis zu 96 Gene x 96 Proben) bis hin zu Einzelgenanalysen mit 96 qPCR. Der größte Vorteil dieses im FBN intensiv eingesetzten Stressnachweisverfahrens bei Fischen besteht darin, dass die Anzahl der produzierten Gentranskripte unter den jeweiligen Umweltbedingungen relativ stabil ist und Fehlmessungen aufgrund akuter Umweltveränderungen, wie Handling-Stress bei der Ernte, vermieden werden.

# Ablauf des Vorhabens

## Arbeitspakete

Das Projekt erfolgte im Rahmen von vier Arbeitspaketen (AP) in enger Kooperation von sechs institutionellen Einrichtungen und zwei Unternehmen unter der Koordination des FBN.
AP1 umfasste die Wissenschaftliche Datenerfassung und tierexperimentelle Arbeiten, während im AP2 die Verwertung der Ergebnisse erarbeitet wurde. AP3 beinhaltete Maßnahmen zum Wissenstransfer und AP 4 das Projektmanagement. In drei Versuchskampagnen fand eine Kombination aus Fütterungsversuchen mit mikroalgenangereicherten Futtermitteln mit drei tierschutzrechtlich abgesicherten Experimenten mit juvenilen Atlantischen Lachsen statt. Für Kampagne 1 erfolgte ein umfassender Fütterungsversuch mit verschiedenen Mikroalgen sowie ein Stressexperiment durch Umsetzung von Lachsen von Brackwasser mit 12‰ auf Salzwasser mit 32‰. In Kampagne 2 erfolgte ein weiterer Fütterungsversuch mit favorisierten Mikroalgen als Futterzusatz. Im Verlauf der Kampagne fand ein Stressexperiment durch Simulation einer Tankreinigung mit Peressigsäure statt. Kampagne 3 schloss sich direkt an den zweiten Fütterungsversuch an und es erfolgte eine Zugabe von Cortisol ins Haltungswasser. Die Tierversuche simulierten jeweils typische und reale Bedingungen in der Aquakultur von Lachsen. Trotz zeitlicher Verschiebungen im Projektablauf durch Pandemiemaßnahmen bedingt, wurden alle Meilensteine des Projektes erfolgreich und fristgerecht abgeschlossen. Die Durchführung der genexpressiven Validierung entwickelter Lachszelllinien wurde im Projektverlauf an das Projekt SensoFiA übertragen. Benötigte Biomarker wurden dafür vom Projekt BioFiA zur Verfügung gestellt.

## Zeitlicher Ablauf des BaMS-BioFiA-Teilprojektes 1

Das Projekt BioFiA war basierend auf dem Arbeitsprogram auf insgesamt drei Jahre ausgelegt. Nach zwei Jahren erfolgten eine Evaluierung und eine Laufzeitverlängerung für die Umsetzungsphase. Die konkrete Laufzeit war vom 01.08.2020 bis 31.07.2023. Das BioFiA-TP1 wurde nach einer kostenneutralen Laufzeitverlängerung nach 3 Jahren und 9 Monaten abgeschlossen. Konkret lief das Projekt vom 01.08.2020 bis 30.04.2024.

Basierend auf der um 3 Monate verzögerten Personalrekrutierung in 2020 und den durch die Pandemie verursachten Verzögerungen zu Beginn der ersten Versuchskampagne waren im Projektzeitraum für das Jahr 2021 geringe zeitliche Verschiebungen im Projektablauf notwendig. Diese zeitlichen Verzögerungen wurden in den verbleibenden Projektmonaten teilweise kompensiert. Dazu wurde der Versuchsansatz entsprechend angepasst und gestrafft. Dies geschah in erster Linie durch eine Kombination von Fütterungsversuchen und Stressversuchen. Die Arbeitsplanung für das gesamte Jahr 2021 wurde entsprechend angepasst, die Gesamtkosten erhöhten sich nicht. Auch in 2022 wurden zeitliche Verzögerungen durch die Coronakrise gut kompensiert. Auch hier gelang dies dadurch, dass Versuchsansätze angepasst und gestrafft wurden und auch der zweite Fütterungsversuch mit dem zweiten Stressversuch kombiniert wurde. Die Gesamtkosten des Teilprojektes blieben dadurch gleich. Da jedoch zeitlich betrachtet absehbar war, dass die vollständige Aufarbeitung von Probenmaterial und deren Publikation sowie auch die erfolgreiche Fertigstellung einer Promotionsarbeit als geplante Qualifizierungsmaßnahme für wissenschaftliches Personal im Projekt eine kostenneutrale Verlängerung des Projektes nach seinem offiziellen Abschluss am 31.07.2023 erforderlich machen, wurden entsprechende Mittel dafür im Projekt, aber auch im FBN-Haushalt vorgehalten. Durch die kostenneutrale Verlängerung des Projektes bis zum

30.04.2024 konnten alle zeitliche Verzögerungen kompensiert werden. Alle Versuchsansätze wurden planmäßig durchgeführt. Die Arbeitsplanung wurde optimiert und die Gesamtkosten wurden eingehalten. Zudem wurde mit Projektende eine Promotionsarbeit fertiggestellt, in der Universität Rostock zur Begutachtung eingereicht und am 18.10.2024 erfolgreich verteidigt.

## Technischer Ablauf der Versuchskampagnen

In der folgenden Abbildung 1 sind die wesentlichen Inhalte der Versuchskampagnen dargestellt. Dazu zählen die eingesetzten Mikroalgen als Futterzusätze und deren Konzentrationen im Futter, der zeitliche Verlauf der Versuchskampagnen und die darin implementierten Fütterungsversuche und Stressexperimente sowie die im Nachgang an den beprobten Fischen durchgeführten Untersuchungen. Aufgabe des FBN war in erster Linie neben der Beprobung der Fische die Erfassung der Genexpression. Genaue Informationen zur Fischhaltung, zum methodischen Ablauf der Versuche und zur bioinformatischen Auswertung der Genexpressionsexperimente sind den angefügten Manuskripten und den Endberichten der anderen BioFiA-Teilprojekte zu entnehmen.

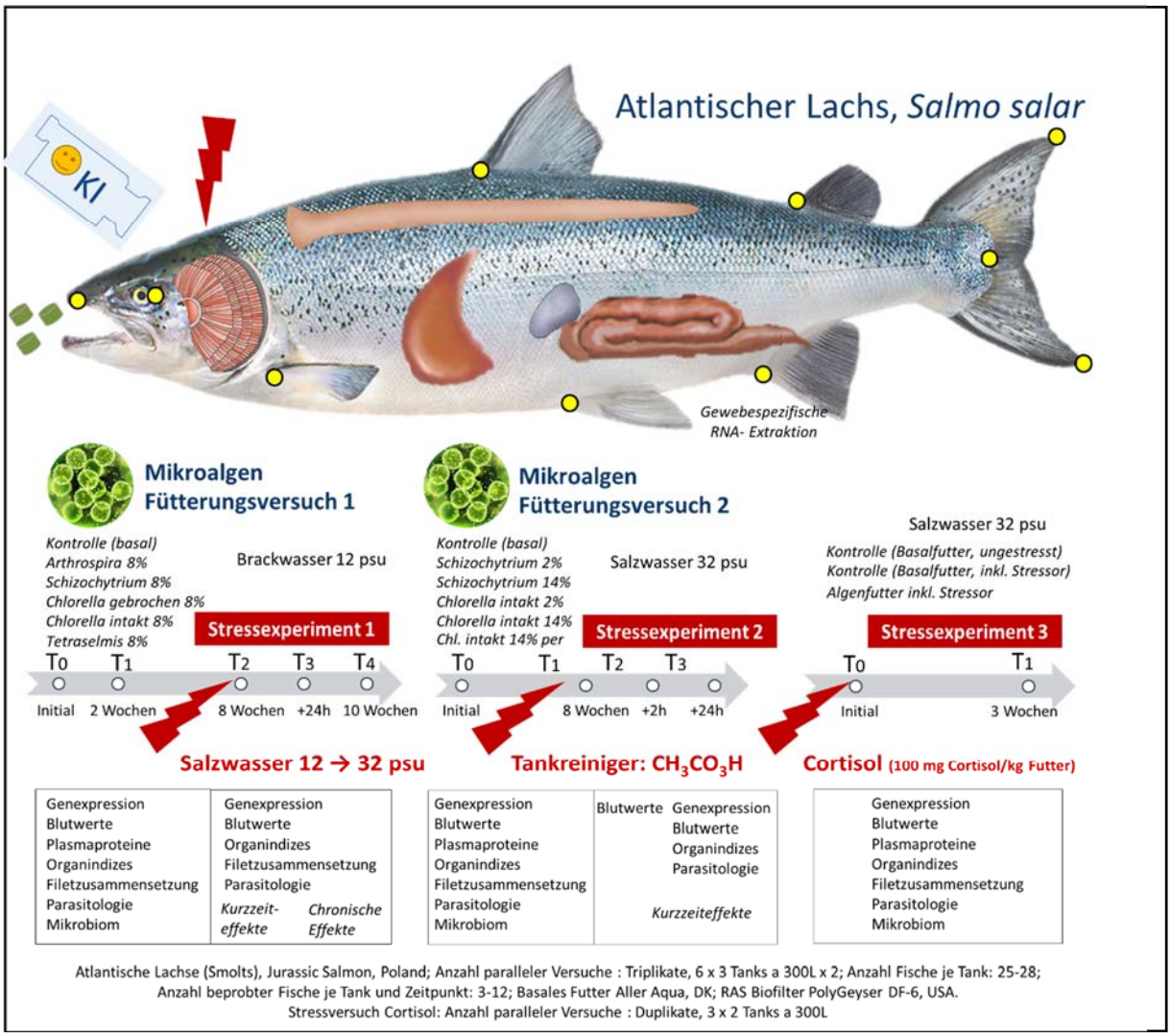


**Abbildung 1.** Graphische Darstellung aller Versuchskampagnen im Projekt BioFiA.

# Ergebnisse und deren Bewertung innerhalb des Vorhabens

## 1. Versuchskampagne

Der Abschluss der ersten Versuchskampagne, gleichzeitig Erreichung des Meilensteines 1 (MS1), bestand in der kontrollierten Umweltauslenkung der Fischhaltung. Die Versuche wurden an juvenilen Lachsen (*Salmo salar*) durchgeführt. Hierzu wurden ein Fütterungsversuch mit fünf verschiedenen Mikroalgendiäten sowie ein Salinitätsstressversuch durchgeführt. Dafür kamen Aquarienanlagen des IMTE in Büsum zum Einsatz, wo auch die Probenahme erfolgte (Abbildung 2).

***Abbildung 2**. Rezirkulierendes Aquakultursystem (links) für die erste Versuchskampgne (ein Strang, ein Biofilter, 10 Becken, 300l/Becken, Fischart: Atlantischer Lachs).*

Für die Versuchsdurchführung wurden Ablaufschemata entwickelt, die darauf abzielten, mit der kleinsten Anzahl an Tieren sowohl die Mikroalgendiäten als auch den Salinitätsversuch durchzuführen. Gewährleistet wurde weiterhin, dass alle Experimente in Triplikaten erfolgten. Das entspricht international gültigen Standards für derartige Versuche und vermeidet eine Fehleinschätzung der Ergebnisdaten (Abbildung 3).

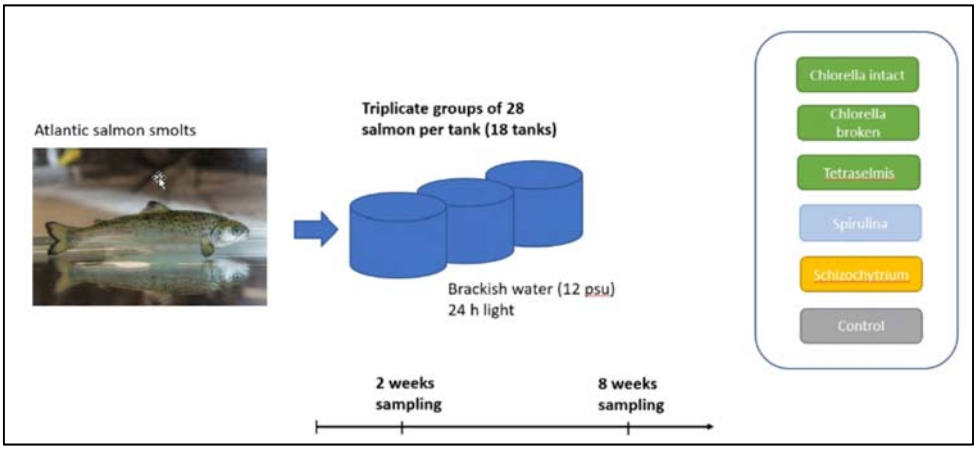


***Abbildung 3**. Versuchsdesign. Im Beispiel sind Mikroalgendiäten dargestellt.*

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben stressreaktiver Gewebe entnommen (Kieme, Kopfniere, Intestinum, Leber, Milz) und mit molekularen, zellulären, ökophysiologischen Stressindikatoren eine Beurteilung des Einflusses der Stressoren auf die Fische durchgeführt (Abbildung 4).

***Abbildung 4**. Vorbereitung der Beprobung von Fischen in Versuchskampagne 1.*

Während die praktischen Arbeiten der Versuchskampagne abgeschlossen wurden, befanden sich insbesondere die essentiellen Genexpressionsdaten noch in der Auswertung. Die durchgeführten Genexpressionsexperimente sind in Abbildung 5 zusammenfassend dargestellt. In den angefügten Manuskripten erfolgen genaue Angaben zu den Experimenten.

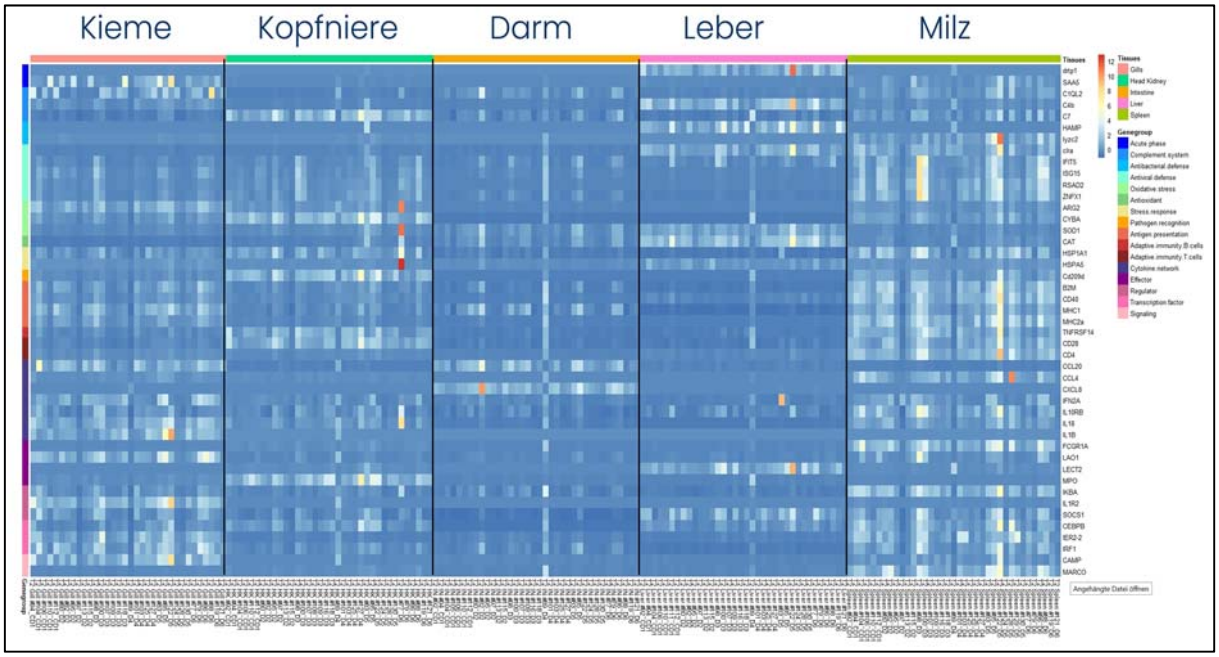


***Abbildung 5**. Heatmap der Expression von 45 Genen in 5 Geweben von Atlantischen Lachsen zu verschiedenen Zeitpunkten der ersten Versuchskampagne. Die Genexpression wurde dabei an den Kontrolltieren ausnivelliert. Davon abweichende höhere Genexpression folgt einer Farbskala oben rechts in der Abbildung. Die Gene wurden entsprechend ihrer Funktionalität in unterschiedlichen Signalkaskaden im Stoffwechsel gruppiert (Skala oben rechts in der Abbildung).*

Die Daten geben Hinweise darauf, dass die verschiedenen Mikroalgendiäten sowie auch der Salzstressversuch zunächst keine sehr starken Änderungen der Genexpression hervorrufen. Dies hat sich nach vollständiger Datenanalyse bestätigt, und ist somit ein erster Hinweis, dass keine oder nur sehr geringe negative Effekte durch die Mikroalgendiäten sowie durch Salzstress zu erwarten sind in der Haltung juveniler Lachse. Weiterhin zeigen die Daten, dass die gewählten Bioindikatoren, die einen sehr breiten Bereich an molekularen Stressantworten im Stoffwechsel abdecken, in ihrer Gesamtheit sehr ähnlich auf die Stressoren reagieren. Auch dies kann als positiv im Sinne einer geringen Stressantwort bewertet werden. Beobachtet wurden einzelne Ausreißer bei Betrachtung der Einzeltiere.

Für die geplante zweite Versuchskampagne (2022) wurden weitere Bioindikatoren entwickelt, um auch Wachstums- und Phänotypdaten besser bewerten zu können und eine zusätzliche Bewertung bzw. Validierung der bisherigen Bioindikatoren mit Fokus auf Stress und Tiergesundheit durchführen zu können.

Mit den hauptverantwortlichen Partnern für weitere Teilaspekte im Gesamtvorhaben BioFiA, an denen auch das FBN beteiligt war, erfolgten neben gemeinsame Probenahmen der Fische, auch deren Echtzeitmonitoring und parasitologische Untersuchungen.

Eine genexpressive Validierung von gewebespezifischen Lachszelllinien hat im Zeitraum noch nicht, wie ursprünglich geplant, durch das FBN stattgefunden. Dem Kooperationsprojekt SensoFiA wurden jedoch molekulare Stressindikatoren zum Nachweis insbesondere immunologischer Reaktionen der Zelllinien auf Stresseinfluss zur Verfügung gestellt. Damit ist gewährleistet, dass dieselben Bioindikatoren sowohl an den beprobten Fischen als auch in den Fischzelllinien für das molekulare Stressmonitoring zur Anwendung gelangen.

Aufgrund der Pandemie konnten im Projekt für 2021 geplante Dienstreisen für Probenahmen an Lachsaquakultur-Standorten in Norwegen (oder alternativen Standorten) nicht stattfinden. Diese wurden daher für das Jahr 2022 geplant. Damit konnte der Zeitplan im Projekt insgesamt gehalten werden.

Gemeinsam mit den Partnern des Projektes SensoFiA wurden Lachszelllinien festgelegt, mit denen *in vitro* das Salinitätsstressexperiment nachgestellt wird.

## 2. Versuchskampagne

In der atlantischen Lachszucht stirbt ein erheblicher Teil der Fische während der Produktion, insbesondere in den ersten Wochen nach dem Seewassertransfer (SWT). Es wird angenommen, dass Stress und ein unterdrücktes Immunsystem nach dem SWT zu einer höheren Anfälligkeit für Infektionskrankheiten führen. Daher sind Präventivmaßnahmen dringend erforderlich, um die Widerstandsfähigkeit von gezüchtetem Atlantischen Lachs *Salmo salar* zu erhöhen, insbesondere unter schwierigen Bedingungen. Mikroalgen zeigen immunstimulierende und stressmodulatorische Eigenschaften, wenn sie Fischen verabreicht werden. Über die Auswirkungen von Mikroalgen als Futtermittelzusatz für Lachse gab es jedoch zum Untersuchungszeitpunkt nur initiale Erkenntnisse aus dem vorliegenden Versuchsansatz (siehe MS1).

Basierend auf den stattgefundenen Untersuchungen bestand für das Jahr 2022 die Notwendigkeit, begonnene Versuche mit juvenilen Lachsen im Hinblick auf die Fütterung mit Mikroalgen und unter Einwirkung von Salinitätsstress zu finalisieren und auch final auszuwerten. Das FBN hatte hierbei die Aufgabe aufzuzeigen, ob die Fische unter den gegebenen Bedingungen mit Distress reagieren oder nicht. Gleichzeitig sollte für die

eingesetzten verschiedenen Mikroalgenarten und -konzentrationen im Fischfutter herausgefunden werden, welche Fütterungsoption die potentiell stressfreieste ist.

Ein wesentliches Ergebnis im Projekt ist der vollständige Abschluss der zweiten Versuchskampagne (MS2). Gemeinsam mit IMT und CAU erfolgte die kontrollierte Umweltauslenkung der Lachse. Hierzu wurden ein Fütterungsversuch mit fünf verschiedenen Mikroalgendiäten sowie ein Salinitätsstressversuch durchgeführt. Alle Versuche fanden in den Kreislaufanlagen des IMT in Büsum statt, wo auch die Probenahme unter Beteiligung des FBN erfolgte.

Für die Versuchsdurchführung wurde wie zuvor ein Ablaufschema entwickelt, welches darauf abzielte, mit der kleinsten Anzahl an Tieren sowohl die Mikroalgendiäten als auch den Salinitätsversuch durchzuführen. Gewährleistet wurde weiterhin, dass alle Experimente in Triplikaten erfolgten. Das entspricht international gültigen Standards für derartige Versuche und vermeidet eine Fehleinschätzung der Ergebnisdaten. Abbildung 6 zeigt vereinfacht das experimentelle Design.

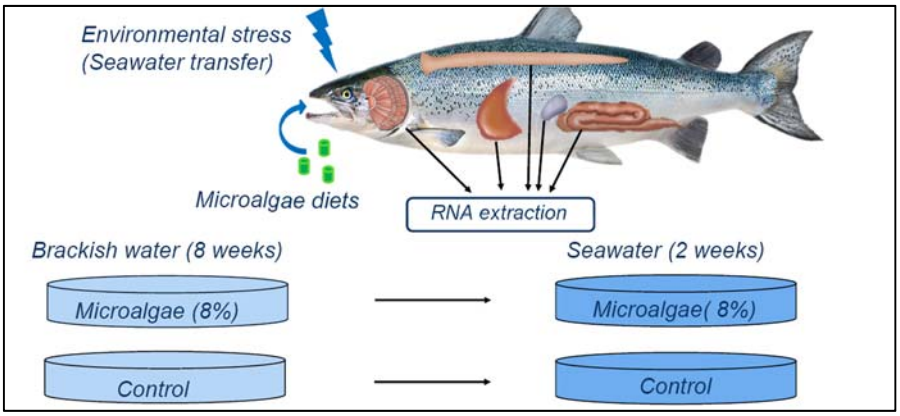


***Abbildung 6**. Vereinfachte Darstellung des Versuchsansatzes.*

An definierten Zeitpunkten wurden Proben stressreaktiver Gewebe entnommen (Kieme, Kopfniere, Intestinum, Leber, Milz) und mit molekularen, zellulären, ökophysiologischen Stressindikatoren eine Beurteilung des Einflusses der Stressoren auf die Fische durchgeführt. Aufgabe des FBN war es auf molekularer Ebene aufzuzeigen, welche Gene, Signalkaskaden und Stoffwechselwege während der Versuche aktiviert bzw. inaktiviert wurden. Die Untersuchungen dazu erfolgten auf der Ebene der Genexpression basierend auf BioChips. Die Expression einer Reihe hier betrachteter Gene auf veränderte Umwelteinflüsse erfolgt im Gegensatz zu hormonellen akuten Stresshormonen zeitlich etwas verzögerter und konstanter. Dies erlaubt eine recht gut verifizierbare Aussage darüber, ob eine bestimmte Mikroalgenart, die Veränderung in der Mikroalgenkonzentration im Futtermittel oder Änderungen in der Salinität tatsächlich einen positiven, neutralen oder negativen Effekt auf die Fische haben. Von Vorteil ist auch, dass auf Basis zahlreicher vergleichbarer Analysen zur Wirkung der von uns gleichzeitig in der Kombination betrachteten Gene, z.B. zur Besatzdichte, Temperaturstress, Hypoxie und anderes mehr an verschiedenen Fischarten, eine hohe Genauigkeit der Ergebnisaussagen zum Stress der Fische in den vorliegenden Experimenten gemacht werden kann. Parallel zu diesen Messungen wurden auch typische und üblicherweise verwendete Stressmarker (Cortisol, Blutparameter) erfasst. Diese Messungen lieferten, wie erwartet, keine signifikanten Daten (*Rebl et al., 2018; Swirplies et al., 2019*).

Da die Menge an vorliegenden und in der 2. Versuchskampagne ausgewerteten Daten den Rahmen des Ergebnisberichtes sprengen würde, soll hier nur exemplarisch die Genexpression in der Kopfniere 8 Wochen nach der Mikroalgendiät und 2 Wochen nach dem Salzwassertransfer vorgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 und 8 zusammengefasst dargestellt.

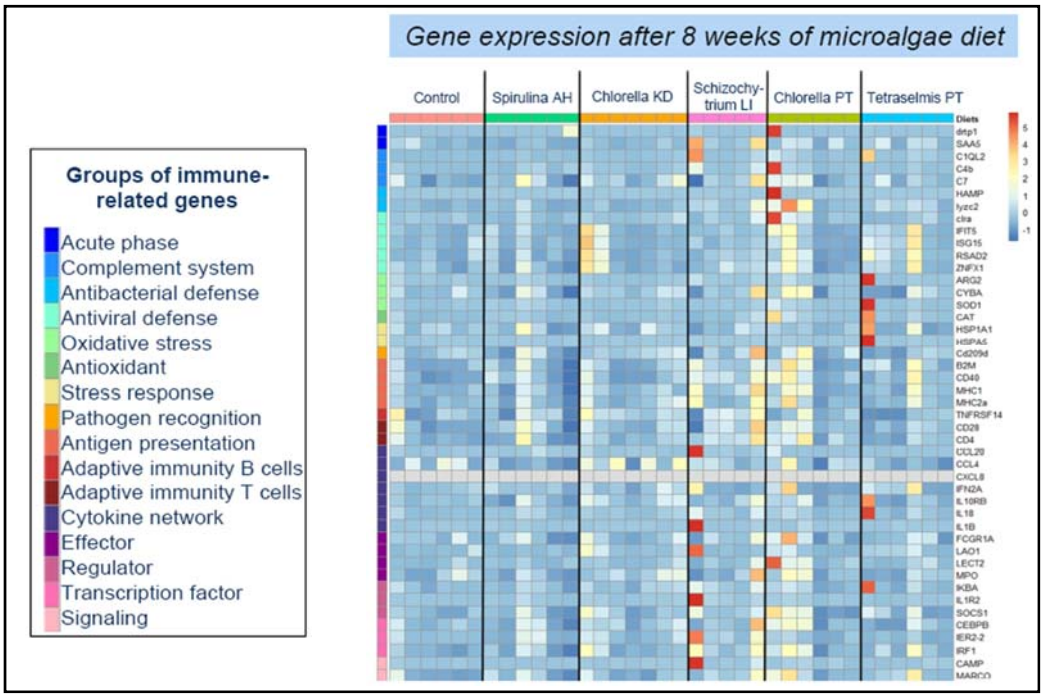


***Abbildung 7**. Heatmap der Expression von 45 Schlüsselgenen mit Funktion in verschiedenen immunologischen Signalkaskaden in der Kopfniere nach Mikroalgendiät.*

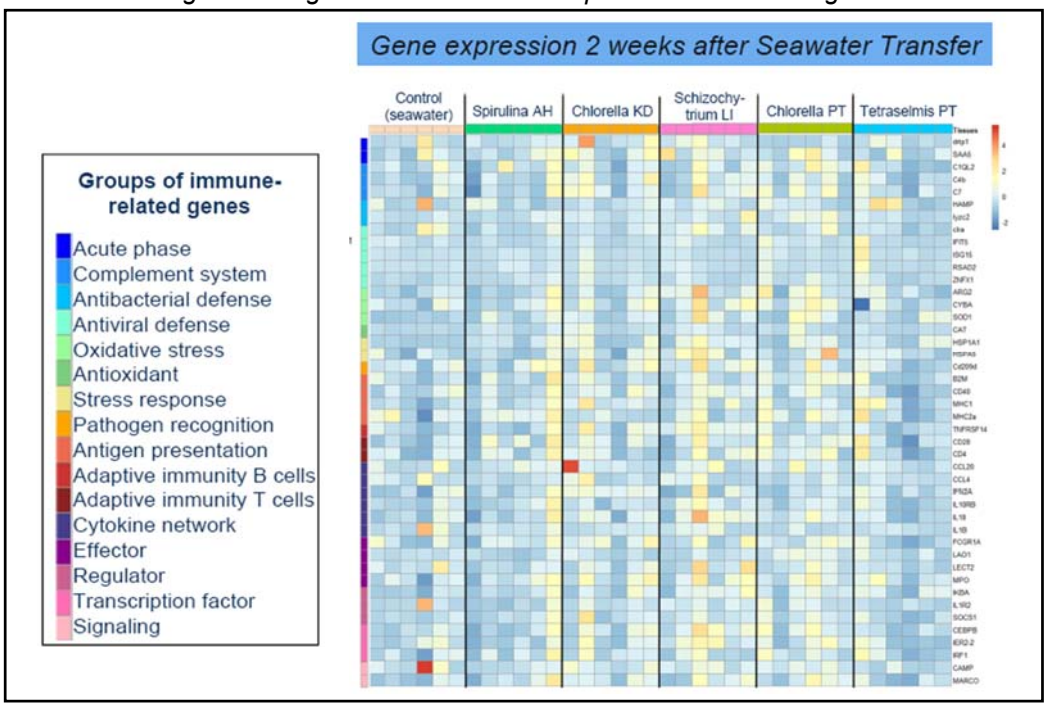


***Abbildung 8**. Heatmap der Expression von 45 Schlüsselgenen mit Funktion in verschiedenen immunologischen Signalkaskaden in der Kopfniere nach Mikroalgendiät und Umsetzung der Fische von Brackwasser (12‰) in Meerwasser (32‰).*

Die Daten zeigen erneut, dass die verschiedenen Mikroalgendiäten sowie auch der Salzstressversuch zunächst keine sehr starken Änderungen der Genexpression hervorrufen. Dies hat sich nach vollständiger Datenanalyse bestätigt. Damit geben die Ergebnisse, wie schon in Versuchskampagne 1 gesehen, starke Hinweise dafür, dass nur sehr geringe negative Effekte durch die Mikroalgendiäten sowie durch Salzstress zu erwarten sind in der Haltung juveniler Lachse. Weiterhin zeigen die Daten, dass die gewählten Bioindikatoren, die einen sehr breiten Bereich an molekularen Stressantworten im Stoffwechsel abdecken in ihrer Gesamtheit sehr ähnlich auf die Stressoren reagieren. Auch dies kann als positiv im Sinne einer geringen Stressantwort bewertet werden. Beobachtet wurden einzelne Ausreißer bei Betrachtung der Einzeltiere. Beobachtet wurde weiterhin, dass der Seewassertransfer dennoch ein Stressfaktor ist. Die tägliche Futteraufnahme der Fische in allen Mikroalgendiäten sank gegenüber den nicht in Meerwasser überführten Kontrolltieren drastisch (Abbildung 9). Einen detaillierten Überblick über die bisherigen Ergebnisse geben die Manuskripte (*Muilekom et al., 2024; Müller et al., 2023*).

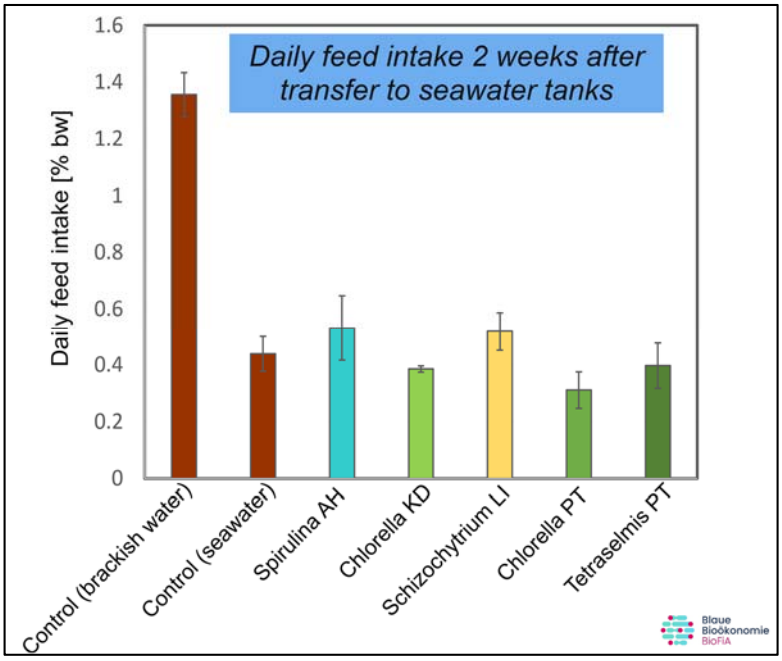


***Abbildung 9**. Tägliche Futteraufnahme der Lachse nach verschiedenen Mikroalgendiäten und Umsetzung der Fische von Brackwasser (12‰) in Meerwasser (32‰).*

Für die dritte Versuchskampagne (2023) wurde neben weiterer Auswertung der Versuchskampagne 2 geprüft, wie chronischer Stress in der RAS-Aquakultur sich auf die Gesundheit und Produktqualität von Lachsen auswirkt. Geprüft wurde seitens des FBN erneut auf Genexpressionsebene, ob die periodische Gabe eines funktionalen Algenzusatzes Stress (Stressor: Cortisol im Produktionswasser) oder negative Auswirkungen auf die Produktqualität verringern kann.
Mit den hauptverantwortlichen Partnern für weitere Teilaspekte im Gesamtvorhaben BioFiA, an denen auch das FBN beteiligt ist, erfolgten neben gemeinsame Probenahmen der Fische, auch deren Echtzeitmonitoring und parasitologische Untersuchungen.

In Projektjahr 2022 fand eine für 2021 geplante Dienstreise für Probenahmen an einem Lachsaquakultur-Standort in Norwegen (Firma SinkabergHansen AS in Rørvik, Norwegen) statt. Diese wurden gemeinsam mit dem Schwesterprojekt SensoFiA erfolgreich durchgeführt (Abbildung 10). Damit wurden zeitliche Engpässe im Projekt kompensiert.

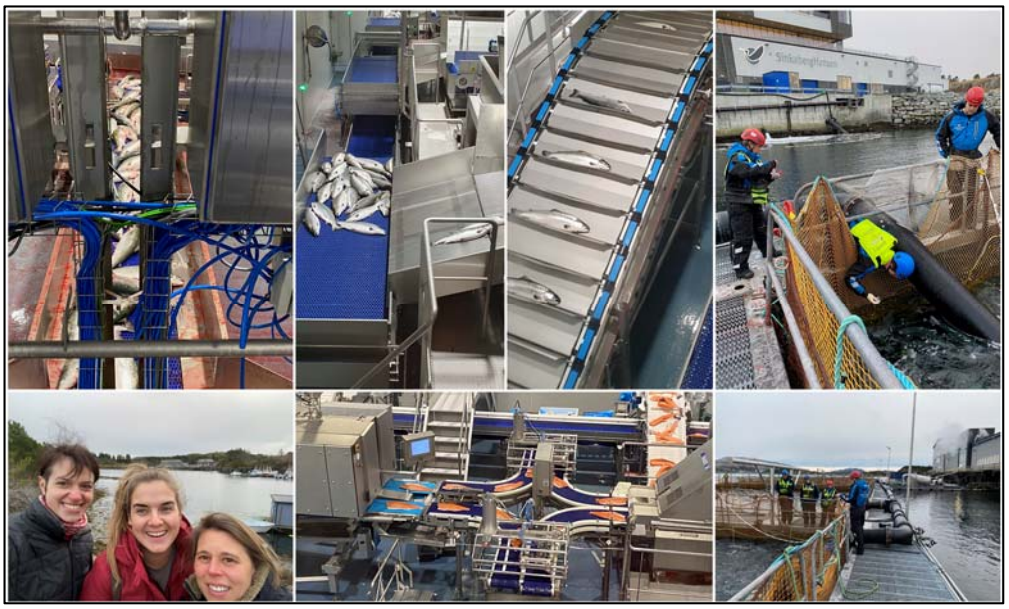

***Abbildung 10**. Impressionen der Norwegen-Exkursion von Projektmitarbeiterinnen der Projekte BioFiA FBN-(Doktorandin Doret van Muilekom unten links Mitte) und SensoFiA (Dr. Isa Kolbe und Dr. Elke Böhme unten links Links bzw. Rechts). Probenahmen während des Ernteprozesses von Lachsen in der Firma SinkabergHansen AS (oben rechts).*

## 3. Versuchskampagne

Die Zucht des Atlantischen Lachses in landgestützten Kreislaufanlagen kann Probleme in Bezug auf die Fischgesundheit mit sich bringen, z. B. durch die routinemäßige Desinfektion. Letztere wird eingesetzt, um ein hohes Maß an Biosicherheit im System aufrechtzuerhalten, doch können Desinfektionsmittel bei den behandelten Fischen Stress und eine Immunreaktion hervorrufen. Peressigsäure (CH3 CO3 H; PAA) ist ein oxidatives Biozid mit breiter antibakterieller Wirkung, das aufgrund seiner geringen wirksamen Dosis, seines schnellen Abbaus und seiner minimalen Umweltauswirkungen häufig verwendet wird. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine akute Exposition gegenüber PAA die Expression antioxidativer Gene (*gpx, sod*) in den Kiemen induziert und das Plasmacortisol und die antioxi-dative Kapazität des Atlantischen Lachses erhöht. Darüber hinaus induzierte die chronische PAA-Exposition die Expression von Immungenen in den Riechrosetten des Atlantischen Lachses und erhöhte die antioxidative Kapazität des Serums und den Gehalt an freien Radikalen in den Kiemen und im Serum von Regenbogenforellen. Funktionelle Futtermittel, basierend auf Mikroalgenanteilen, können den allgemeinen Gesundheitszustand von Fischen verbessern. Es wurde daher angenommen, dass die Fütterung des funktional angereicherten Futters den stress- und immunbezogenen Auswirkungen der Behandlung mit PAA als oxidativem Stressor entgegenwirkt. Das FBN hat auf molekularer Ebene diese Annahme geprüft (*Müller et al., 2024*).

So waren Markergene, die auf die Aktivierung der Th1-gerichteten Immunität (*il18; Interleukin 18, ccl4; Chemokin C-C-Motiv-Liganden 4*) und das Vorhandensein von T-Zellen (*cd28;*

*Cluster of differentiation 28*) hinweisen, in der Kopfniere von Fischen, die mit CD gefüttert wurden, signifikant reduziert, was auf die Migration von Immunzellen, einschließlich APCs und CD28-positiven T-Zellen, von der Kopfniere in die Peripherie hindeutet. In den Kiemen wurden *il18* und *cd4 (Cluster of Differentiation 4)* induziert, was auf die Einwanderung von Immunzellen, insbesondere (CD4-positiven) T-Zellen, in die Kiemen hindeutet. Dies steht im Einklang mit *Gomez et al. (2013*), wo in Schleimhautgeweben wie der Kieme eine große Anzahl von CD4- und CD28-positiven T-Zellen gefunden wurde. Es kann davon ausgegangen werden, dass in den Kiemen von Fischen, die mit Kontrolldiät (CD) gefüttert wurden, nach der PAA-Exposition eine leichte angeborene Immunreaktion auftrat, da eine induzierte Expression von Genen beobachtet wurde, die für Rezeptoren wie *Clra (c-Typ Lektinrezeptor A)* und *Tnfrsf14 (TNF receptor superfamily member 14)* kodieren. Der von *Clra* kodierte Pathogenrezeptor bindet Lektine, d.h. kohlenhydratbindende Proteine, die Krankheitserreger erkennen. Das TNFRSF14-Protein wird auf verschiedenen Zellen exprimiert und aktiviert nach Bindung an seinen Liganden den NF-κB-Signalweg, was zur Expression von Zellüberlebensgenen führt und steuert T-Zell-Immunantworten. Dies deutet auf eine Migration myeloischer Zellen in die Kiemen hin. Darüber hinaus wurden in der Kieme nach PAA-Exposition nachgeschaltete Signalisierungsgene wie *cebpb* und *ikba* induziert. *Cebpb* kodiert den Transkriptionsfaktor CCAAT/enhancer-binding protein β, der den Zellzyklus, die Hämatopoese und die Immunität reguliert und *ikba* (kodiert für NF-κB-Inhibitor α) kontrolliert den NF-κB-Transkriptionsfaktor, der ein wichtiger Treiber von Immun- und Stressreaktionen bei Salmonidenfischen ist. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Carletto et al. (2022) sind die Transkriptionswerte von *Cat (Katalase)* in den Kiemen erhöht, was auf eine Gegenreaktion als Reaktion auf PAA hindeutet. Stressbezogene Gene (*drtp1; differentially regulated trout protein 1, ier2-2; immediate early response 2-2)* waren in den Kiemen erhöht, während in der Kopfniere *ier2*-2 und *hspa5 (heat shock protein family A (Hsp70) member 5)* nach PAA-Exposition reduziert waren. Die genauen Funktionen von *drtp1* und *ier2-2* sind noch nicht vollständig geklärt. Aber wie *hspa5* scheinen sie auf externe Stimuli wie Stress zu reagieren. Dies deutet darauf hin, dass PAA in erster Linie eine lokale Stressreaktion in den Kiemen auslöst, die auch Mechanismen in der Kopfniere von mit CD gefütterten Fischen aktiviert.

Insgesamt deuten die Genexpressionsdaten darauf hin, dass Immunzellen aus der Kopfniere in das Schleimhautgewebe der Kiemen wandern, wo eine lokale Immun- und Stressreaktion durch die PAA-Behandlung bei Fischen, die mit CD gefüttert wurden, aktiviert wurde. Als Folge der Exposition gegenüber dem chemischen Oxidationsmittel PAA wurde eine Zunahme von Antioxidantien und Proteinen zur Reparatur von geschädigtem Gewebe erwartet. Eine starke Immunreaktion war jedoch nicht zu erwarten, da es keine sichtbaren Verletzungen an den

Kiemen der Lachse gab und die Fische außerdem in einer geschützten RAS-Umgebung gehalten wurden.

Die PAA-Behandlung wirkte sich auf die Immun- und Stressreaktion von mit *Chlorella vulgaris* Diät 14% (CV14) gefütterten Fischen aus, was durch eine signifikant unterschiedliche Expression mehrerer ausgewählter Gene festgestellt wurde. In der Kopfniere konnte eine verringerte Expression von Genen festgestellt werden, die an der Th1-fokussierten Immunität (*il18*) und der Stressreaktion (*hspa5*) beteiligt sind. Da eine verringerte Expression nach PAA-Behandlung für *il18* in allen Ernährungsgruppen und für *hspa5* bei Fischen, die mit CD und CV14 gefüttert wurden, beobachtet wurde, scheint diese Verringerung in erster Linie durch den oxidativen Stressor bedingt zu sein. Darüber hinaus unterdrückte die PAA-Behandlung bei Fischen, die mit CV14 gefüttert wurden, die Expression von Genen, die an Immunfunktionen beteiligt sind, nämlich T-Zell-Immunantworten (*tnfrsf14*), Bindung von Wirtsantikörpern, die z. B. Antigene präsentieren (*fcgr1a*; *Fc-Gamma-Rezeptor Ia*), antivirale Abwehr (*ifit5*), entzündungshemmende Reaktion (*arg2*) und antimikrobielle Abwehr (*mpo; Myeloperoxidase*). Die Verringerung dieser Genprodukte lässt auf einen verminderten Immunschutz in der Kopfniere schließen. In den Kiemen von Fischen, die mit CV14 gefüttert wurden, induzierte PAA die Expression von Genen, die mit der Stressreaktion (*drtp1*), der Erregererkennung (*clra*), der antioxidativen Aktivität (*cat*), der Antigenpräsentation (*b2m*) und der Regulierung der Gentranskription (*ikba*, *cebpb*) in Verbindung stehen. Da die gleiche Wirkung bei Fischen beobachtet wurde, die mit CD gefüttert wurden, ist diese induzierte Expression wahrscheinlich durch den oxidativen Stressor bedingt und wird durch die Chlorella-Supplementierung nicht stark verändert. Die Expression von *marco* und *lao1 (l-Aminosäure-Oxidase 1)* war jedoch auch bei Fischen, die mit CV14 gefüttert wurden, nach PAA-Exposition deutlich erhöht. Da *marco* für einen Rezeptor zur Erkennung von Krankheitserregern und *lao1* für ein Enzym mit antibakterieller und antiparasitärer Wirkung kodiert, könnte die Induktion dieser Gene auf die bioaktiven und immunmodulierenden Eigenschaften von *Chlorella vulgaris* zurückzuführen sein. Kürzlich wurde berichtet, dass *Chlorella vulgaris* eine antibakterielle Wirkung ausübt, die auf ihren Gehalt an Polysacchariden, Chlorophyllin und Lipiden zurückgeführt wird (Hussein et al. 2018; Aly et al., 2023; Krüger et al. 2019). Interessanterweise konnten wir in den Kiemen nach der PAA-Behandlung auch eine verringerte Transkription von *hspa1a* (*Hitzeschock-protein mit 70 kDa)* und einen Anstieg der *drtp1*-Expression feststellen, wobei beide Gene an der Stressreaktion beteiligt sind.

Während bei Fischen, die mit CD und CV14 gefüttert wurden, eine unterschiedliche Expression mehrerer ausgewählter immun- und stressbezogener Gene beobachtet wurde, hatte die Exposition gegenüber PAA vernachlässigbare Auswirkungen auf die Expression ausgewählter Gene bei Fischen, die mit CV14w gefüttert wurden. In der Kopfniere reduzierte PAA neben einer Verringerung der *il18*-Expression auch die Expression von *sod1*, was auf

eine verringerte antioxidative Aktivität hindeutet. In den Kiemen war nur das mit dem Virus in Verbindung stehende Gen *rsad2* bei Fischen, die mit CV14w gefüttert wurden, nach PAA-Exposition signifikant erhöht. Darüber hinaus wurden unabhängig vom oxidativen Stressor bei Fischen, die mit CV14w gefüttert wurden, im Vergleich zu Fischen, die mit CD gefüttert wurden, induzierte Transkriptmengen von *ier2-2* gemessen, was auf eine aktivierte unmittelbare frühe Reaktion hinweist. Auf der Transkriptionsebene zeigte sich bei Fischen, die mit dem Kontrollfutter und einem mit 14 % *C. vulgaris* angereicherten Futter gefüttert wurden, eine Immun- und Stressreaktion bei Exposition gegenüber PAA, während bei Fischen, die einmal wöchentlich 14 % *C. vulgaris* erhielten, diese Marker keine induzierte Immun- und Stressreaktion zeigten (Abbildung 11).

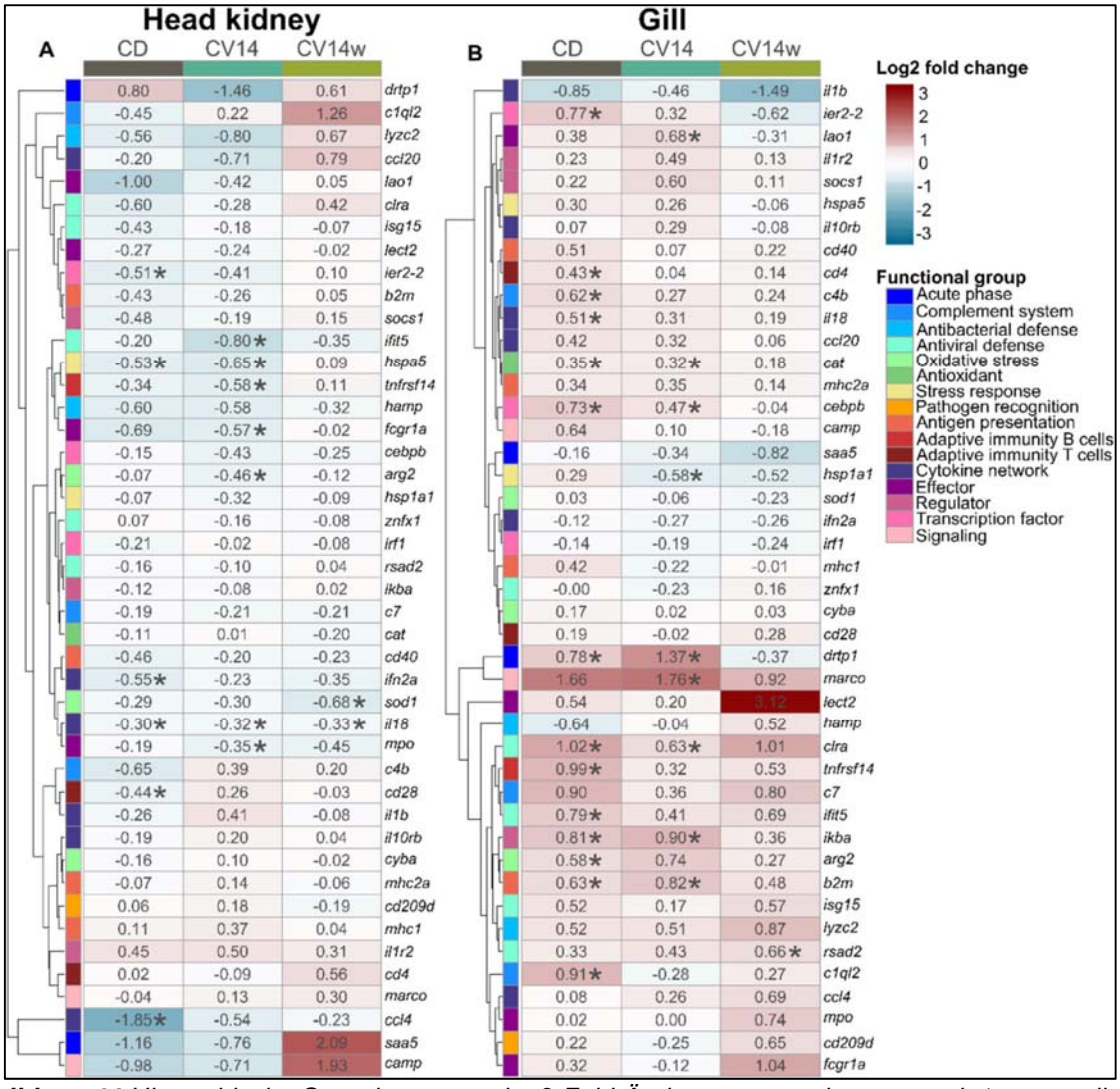


***Abbildung 11*** *Hierarchische Gruppierung von log2-Fold-Änderungen von immun- und stressregulierten Genen in der Kopfniere (A) und den Kiemen (B) von Atlantischem Lachs, der acht Wochen lang mit C. vulgaris-angereicherten Futtermitteln gefüttert wurde, nach Exposition gegenüber oxidativem Stress und im Verhältnis zu den anfänglichen Genexpressionswerten ausgewählter Gene auf der Grundlage ihrer relativen Transkriptionsniveaus. Die Expression ausgewählter Gene wurde mit quantitativer PCR (qPCR) untersucht. Die statistische Signifikanz im Vergleich zu den Werten vor dem Stress innerhalb der entsprechenden Ernährungsgruppe wurde durch paarweise Kontraste bewertet (*p < 0,05). Die*

*Zeilen stellen verschiedene Gene dar, die in Funktionsgruppen eingeteilt sind, wie in der Legende rechts dargestellt. Die Spalten zeigen Fische, die mit einer Kontrollnahrung (CD), einer Nahrung mit 14 % C. vulgaris (CV14) täglich oder einer Nahrung mit 14 % C. vulgaris einmal wöchentlich (CV14w) gefüttert wurden. Jede Zelle ist entsprechend der in der Legende rechts dargestellten Faltenänderung dieses Gens farbig markiert. Für beide Abbildungen (A, B) n = 11–12 pro Zeitpunkt und Ernährungsgruppe.*

Aufgrund der vergleichbaren Wachstumsleistung und der beobachteten primären adaptiven Stressreaktion in allen Fütterungsgruppen scheint es nicht so zu sein, dass die mit CV14w gefütterten Fische einen beeinträchtigten Immun- und Stressstatus haben, sondern eher eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen PAA. Außerdem kann *C. vulgaris* aufgrund der begrenzten Auswirkungen von PAA als Stressor möglicherweise nicht sein volles ernährungsbedingtes Potenzial auf den Immun- und Stressstatus der Fische entfalten. Insgesamt zeigte sich, dass die Gesundheit des Atlantischen Lachses durch die Verabreichung von *Chlorella vulgaris* mit der Nahrung beeinflusst werden kann, dass aber die Darmmikrobiota und die Stressresistenz durch den Grad der Aufnahme und die Art der Verabreichung unterschiedlich beeinflusst werden.

## Molekulare Prüf- und Monitoringmechanismen für das Fischwohl

Das Wohlergehen von Zuchtfischen ist eines der Hauptanliegen der nachhaltigen Aquakulturproduktion. Indikatoren zur Bestimmung des Wohlbefindens entwickeln sich weiter, wobei es verschiedene Ansätze zur Bewertung gibt (*Raposo de Magalhães et al., 2020*). Diese Methoden sind jedoch nicht immer zuverlässig, so dass neue Bioindikatoren benötigt werden, die einfach zu verwenden und zuverlässig sind und verschiedene verhaltensbezogene und physiologische Aspekte abdecken. Das aktuelle Konzept des Tierschutzes berücksichtigt auch die adaptive und dynamische Natur von Organismen (*Raposo de Magalhães et al., 2020*). Dazu gehört die Fähigkeit, durch endogene Veränderungen bei sich ändernden Umweltbedingungen eine Homöostase zu erreichen. Aufgrund der potenziell subtilen Veränderungen durch neue Haltungsstrategien ist die breite Palette von Parametern wichtig, um ein vollständiges Bild der Auswirkungen dieser neuen Strategien und der potenziell vorteilhaften Rolle von Stimulanzien in der Ernährung zu vermitteln.

Die im Projekt gemessenen indikativen Parameter spiegeln den Gesundheits- und Wohlfahrtsstatus von Zuchtlachsen auf verschiedenen Ebenen wider, von der Wachstumsleistung und Futteraufnahme bis hin zu Organindizes, Blutparametern und der Expression von stress- und immunbezogenen Genen. Die in den Studien gemessenen Gene wurden aus einem etablierten Satz von Genen zur Bewertung der Immunkompetenz bei gezüchtetem Atlantischen Lachs ausgewählt (*Krasnov et al., 2020*) und decken verschiedene Funktionsgruppen und Signalwege des gesamten Immunsystems ab. Darüber hinaus wurden sie nicht nur im Hinblick auf eine unterschiedliche Expression bei immunologischen

Herausforderungen ausgewählt, sondern auch im Hinblick auf wichtige Immunfunktionen, die nicht notwendigerweise eine starke Transkriptionsregulierung aufweisen, wie etwa Gene, die an der erworbenen Immunität beteiligt sind (*Krasnov et al., 2020*). Aus diesem Grund war dieser Gensatz gut auf die durchgeführten Studien anwendbar, die alle realistische Bedingungen in der Aquakultur untersuchten und somit nicht unbedingt negative Auswirkungen und ein beeinträchtigtes Immunsystem erwarten ließen. Die Genexpressionsanalyse ergänzt herkömmliche Indikatoren wie die Plasmaspiegel von Cortisol und Glukose, die sich als alleinige Parameter als unzuverlässig erwiesen haben und aufgrund von Stress bei der Probenahme selbst anfällig für Verzerrungen sind. Durch die Messung der Expression eines breiten Spektrums immun- und stressbezogener Gene in verschiedenen Geweben erhält man zudem Einblick in die Dynamik und die betroffenen Signalwege. Insbesondere unter wechselnden Bedingungen, wie in den vorliegenden Studien, gibt die Erstellung von Genexpressionsprofilen Aufschluss über den Immun- und Stressstatus und damit über die Immunkompetenz der Fische.

Basierend auf den Versuchskampagnen haben sich eine Reihe von Bioindikatoren als tauglich für die Dokumentation des Tierwohls bei Atlantischen Lachsen erwiesen. In den Tabellen 1-5 sind alle Bioindikatoren aufgeführt, die durch die verschiedenen untersuchten Bedingungen und Futtermittel signifikant beeinflusst wurden. Insgesamt kann der Schluss gezogen werden, dass sich die Fische zu jedem Zeitpunkt der Versuchskampagnen in einem guten Gesundheitszustand befanden, da in den Untersuchungen keine schädlichen Werte der indikativen Parameter festgestellt wurden. Bioindikatoren können nicht nur einen Hinweis auf den allgemeinen Gesundheitszustand geben, sondern auch die Wechselwirkungen zwischen bestimmten biologischen Systemen und einer Veränderung oder einem Agens in der Umwelt widerspiegeln (*World Health Organization, 1993*). Die Bioindikatoren werden für eine Überführung in routinemäßige Ananlysen zum Tierwohl in der Aquakultur von Atlantischen Lachsen vorgeschlagen. Sie bieten sich auch an für Ertstanalysen zum Tierwohl in anderen Fischarten.

**Tabelle 1.** Signifikant betroffene Ganzkörperindikatoren.

| Bioindikator | Behandlung | Richtung | Effekt-Spezifikationen |
|---|---|---|---|
| Ganzkörper-Indikatoren | | | |
| DFI | Salzgehalt | ⇩ | In allen Gruppen im Vergleich zu vor der SWT |
| CF | CVB | ⇩ | Im Vergleich zu CD |
| FCR | CVB | ⇩ | Im Vergleich zu CD |
| | CV14 | ⬆ | Im Vergleich zu CD |
| SGR | CV14 | ⇩ | Im Vergleich zu CD |
| PER | CV14 | ⇩ | Im Vergleich zu CV2 + CV14w |

| | | | |
|---|---|---|---|
| PRE | CV2 | ↑ | Im Vergleich zu CD + CV14 |
| | CV14w | ↑ | Im Vergleich zu CD + CV14 |
| Asche %. | CV14 | ↑ | Im Vergleich zu CD |

CD (Kontrollfutter); CF (Fulton's condition factor); CV14 (*C. vulgaris* 14% täglich); CV14w (*C. vulgaris* 14% einmal wöchentlich); CV2 (*C. vulgaris* 2% täglich); CVB (*C. vulgaris* gebrochen 8% täglich); DFI (tägliche Futteraufnahme); FCR (feed conversion ratio); PER (protein efficiency ratio); PRE (protein retention efficiency); SGR (specific growth rate); SWT (seawater transfer).

**Tabelle 2.** Signifikant beeinflusste Indikatoren für die Muskelzusammensetzung.

| Bioindikator | Gewebe | Behandlung | Richtung | Effekt-Spezifikationen |
|---|---|---|---|---|
| Indikatoren für die Muskelzusammensetzung | | | | |
| Gehalt an Muskelfett | Muskeln | AP | ⇩ | Im Vergleich zu CD |
| | | SL | ⇩ | Im Vergleich zu CD |
| Zusammensetzung der Fettsäuren | Muskel-lipide | Alle Diäten | - | Reflexion von Mikroalgen in Futtermitteln |
| Karotinoid: Lutein | Muskeln + Plasma | CVI | ↑ | Bei 8 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| | Muskeln + Plasma | CVB | ↑ | Bei 8 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| | Muskeln + Plasma | TC | ↑ | Bei 8 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| Karotinoid: Violaxanthin | Muskeln | TC | - | Nachweisbar |
| Karotinoid: Zeaxanthin | Muskeln | AP | - | Nachweisbar |
| | | TC | - | Nachweisbar |

*AP (A. platensis 8% täglich); BW (Brackwasser); CD (Kontrollfutter); CVB (C. vulgaris gebrochen 8% täglich); CVI (C. vulgaris intakt 8% täglich); SL (S. limacinum 8% täglich); TC (T. chuii 8% täglich); wks (Wochen).*

Zu den Bioindikatoren, die durch die Stimulanzien in der Nahrung (hier Mikroalgen) besonders beeinflusst wurden, gehören der Cholesterinspiegel im Plasma und die Myeloperoxidase-Konzentration in der Leber (Tabelle 3 und 4). Darüber hinaus spiegelte der Fettsäure- und Carotinoidgehalt des Fischmuskels die Fettsäure- und Carotinoidzusammensetzung der an die Fische verfütterten Mikroalgenart wider (Tabelle 4). Diese Parameter können daher als Bioindikatoren verwendet werden, die anzeigen, wie z.B. das Fleisch durch mit Mikroalgen angereichertes Futter beeinflusst wird. Die Bioindikatoren, die am stärksten auf veränderte Haltungsbedingungen in Kombination mit den in unseren Studien verwendeten Nahrungsstimulanzien reagierten und signifikant beeinflusst wurden, waren der Plasmaglukosespiegel, die Häufigkeit des Sod1-Proteins in den Organen und die Expression der genbasierten Indikatoren *c1ql2, drtp1, ifit5, il18* und *saa5* (Tabellen 3-5). Darüber hinaus gibt es eine klare Auswirkung der veränderten Aufzuchtbedingungen auf den Cortisolspiegel, was die Rolle des Stressindikators bestätigt.

**Tabelle 3.** Physiologische Indikatoren, die signifikant betroffen sind.

| Bioindikator | Gewebe | Behandlung | Richtung | Effekt-Spezifikationen |
|---|---|---|---|---|
| Physiologische Indikatoren | | | | |
| AST | Plasma | CVI | ⇩ | Bei 8 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| ALT | Plasma | CVI | ⇩ | Bei 8 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| Cholesterin | Plasma | CVI | ⬆ | Zwischen 2 und 8 Wochen in BW, im Vergleich zu CD |
| | | CVB | ⬆ | Zwischen 2 und 8 Wochen in BW, im Vergleich zu CD |
| | | TC | ⬆ | Zwischen 2 und 8 Wochen in BW, im Vergleich zu CD |
| Glukose | Plasma | SL | ⬆ | Zwischen 2 und 8 Wochen in BW, im Vergleich zu CD |
| | | AP | ⬆ | Zwischen 2 und 8 Wochen in BW, im Vergleich zu CD |
| | | PAA | ⬆ | 1 Stunde nach der PAA-Exposition (für alle Ernährungsgruppen) |
| Natrium | Plasma | Salzgehalt | ⬆ | 20 Stunden nach dem SWT |
| Chlorid | Plasma | Salzgehalt | ⬆ | 20 Stunden nach dem SWT |
| Cortisol | Plasma | Salzgehalt | ⬆ | Um 20 Uhr in SW im Vergleich zu Fischen in BW |
| | | Salzgehalt | ⇩ | Zwischen 20 h und 2 Wochen nach SWT |
| | | PAA | ⬆ | 1 Stunde nach PAA (für alle Ernährungsgruppen) |

*ALT (Alanin-Aminotransferase); AP (A. platensis 8% täglich); AST (Aspartat-Aminotransferase); BW (Brackwasser); CD (Kontrolldiät); CVB (C. vulgaris gebrochen 8% täglich); CVI (C. vulgaris intakt 8% täglich); h (Stunden); PAA (Peressigsäure); SL (S. limacinum 8% täglich); SWT (Meerwasser-Transfer); TC (T. chuii 8% täglich); wks (Wochen)*

Die verschiedenen Indikatoren lassen sich allgemein in Stressindikatoren (Glukose, Cortisol, *drtp1*) und Indikatoren für die Immunreaktion wie die antivirale Abwehr (*ifit5*), die akute Phase (*saa5*), die Th1-Immunität (*il18*) und ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität (*c1ql2*) einteilen. Unsere Studien zeigen, dass diese Bioindikatoren empfindlich auf Veränderungen reagieren, obwohl es wichtig ist zu betonen, dass dies spezifisch für die veränderten Aufzuchtbedingungen und die in unseren Studien verwendeten Nahrungsstimulanzien ist. Dennoch kann der Schluss gezogen werden, dass diese Bioindikatoren nützlich sind, um sie in zukünftige Forschungen einzubeziehen, die die Auswirkungen anderer Bedingungen auf das Wohlergehen der Fische untersuchen.

Im Falle eines geschwächten Immunsystems wird entweder eine Verringerung der Genexpression (Immunsuppression), eine Induktion der Genexpression (Infektion oder Überstimulation) oder ein Ungleichgewicht (starke Unterdrückung und Überstimulation mehrerer Gene) erwartet (*Krasnov et al., 2020*). Die erhaltenen Ergebnisse sprechen nicht für ein kompromittiertes Immunsystem, sondern eher von milden Immun- und Stressreaktionen, die höchstwahrscheinlich zur Wiederherstellung der Homöostase nach Veränderungen der Umweltbedingungen notwendig waren. Aufgrund der leichten Reaktionen war die Interpretation der unterschiedlich exprimierten Gene nicht immer einfach. Neben einer

adaptiven Reaktion auf sich ändernde Bedingungen können solche leichten Reaktionen auch aus Tagesrhythmen oder dem Wachstum der Fische resultieren (*Kajita et al., 1992; Montero et al., 2020; Sakai et al., 1996; Wang et al., 2022*).

**Tabelle 4.** Organ-Proteinindikatoren, die signifikant betroffen sind.

| Bioindikator | Gewebe | Behandlung | | Richtung | Effekt-Spezifikationen |
|---|---|---|---|---|---|
| Organ-Proteinindikatoren | | | | | |
| Mpo | Leber | CD | | ↑ | Zwischen 20 h und 2 Wochen nach dem SWT, im Vergleich zu mit CD gefütterten Fischen |
| | | CVB | | ↑ | Zwischen 20 h und 2 Wochen nach dem SWT, im Vergleich zu mit CVB gefütterten Fischen |
| | | AP | | ↑ | Zwischen 20 h und 2 Wochen nach dem SWT, im Vergleich zu mit AP gefütterten Fischen |
| | | AP | | ↓ | Bei 2 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| Sod1 | Leber | CVI | | ↓ | Zwischen 20 h und 2 Wochen nach dem SWT, im Vergleich zu mit CVI gefütterten Fischen |
| | | TC | | ↓ | Zwischen 20 h und 2 Wochen nach dem SWT, im Vergleich zu mit TC gefütterten Fischen |
| | | CV2 | PAA | ↓ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | | CV14 | PAA | ↓ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | Kiemen | CV2 | PAA | ↓ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | | CV14 | PAA | ↓ | Im Vergleich zu vor PAA |
| Cat | Leber | CD | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | | CV14w | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | Kiemen | CV2 | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |

*AP (A. platensis 8% täglich); Kat (Katalase); CD (Kontrolldiät); CV14 (C. vulgaris 14% täglich); CV14w (C. vulgaris 14% einmal wöchentlich); CV2 (C. vulgaris 2% täglich); CVB (C. vulgaris gebrochen 8% täglich); CVI (C. vulgaris intakt 8% täglich); h (Stunden); Mpo (Myeloperoxidase); PAA (Peressigsäure); Sod1 (Superoxiddismutase 1); SWT (Meerwassertransfer); TC (T. chuii 8% täglich); wks (Wochen)*

Darüber hinaus ist es auch schwierig festzustellen, ob die unterschiedliche Genexpression die Ursache oder die Folge eines Zustandes ist. Da zum Beispiel eine stimulierende Wirkung auf die Immunreaktion und/oder eine modulierende Wirkung auf die Stressreaktion durch Mikroalgen erwartet wurde, war die Interpretation im Falle einer Verringerung der Genexpression nach der Ergänzung der Ernährung mit Mikroalgen schwierig. Die Reduktion der Genexpression scheint in diesem Fall entweder durch bioaktive Moleküle aus den Mikroalgen verursacht zu werden oder die bioaktiven Moleküle hemmen die Funktion des Gens, was möglicherweise die Gesundheit der Fische beeinträchtigt. Hierüber sowie darüber, welche spezifischen bioaktiven Moleküle der Mikroalgen für bestimmte Effekte verantwortlich sind, können nur Vermutungen angestellt werden. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um beispielsweise die Normen für die unterschiedliche Genexpression zu bestimmen, die auch die Transkriptionsregulierung der einzelnen Gene berücksichtigen.

Wichtige Regulatoren von Immun- und Stressreaktionen sind außerdem die NF-κB-Transkriptionsfaktoren. Als Reaktion auf ein breites Spektrum von Reizen wird NF-κB aktiviert und induziert die Expression vieler verschiedener Gene. In dieser Arbeit wurde IκB in Salmoniden untersucht und charakterisiert, einer der wichtigsten Regulatoren von NF-κB, der als potenziell nützlicher Bioindikator für Immun- und Stressreaktionen dienen kann. In meiner Studie wurde eine breite Palette von IκB-Proteinen bei Salmoniden mit unterschiedlichen Eigenschaften, Funktionen und gewebespezifischen Expressionsmustern identifiziert (*van Muilekom et al., 2023*). In früheren Studien wurde die Expression von nfkbia als ein indikativer Parameter für eine immunologische Herausforderung, eine toxische Exposition oder eine spezifische Ernährung beschrieben (*Eslamloo et al., 2016; Kaleo et al., 2019; Sood et al., 2021; C. Zhang et al., 2021*). Die vorliegenden Ergebnisse stimmen damit überein, dass die Expression von *nfkbia* nach Pilzstimulation *in vitro* und PAA-Exposition *in vivo* zunimmt (*van Muilekom et al., 2023*). Weitere Forschung über die genaue Rolle und Funktion der anderen Mitglieder der IκB-Familie in Salmoniden ist dazu erforderlich.

**Tabelle 5.** Genbasierte Indikatoren, die maßgeblich betroffen sind.

| Bioindikator | Gewebe | Behandlung | | Richtung | Effekt-Spezifikationen |
|---|---|---|---|---|---|
| Genbasierte Indikatoren | | | | | |
| *arg2* | Kiemen | CD | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | Kopfniere | CV14 | PAA | ↓ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *b2m* | Kiemen | CV14 | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | Kiemen | CD | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *c1ql2* | Leber | CVI | | ↑ | Bei 8 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| | | SL | | ↑ | Bei 8 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| | Kiemen | Salzgehalt | | ↓ | 20 Stunden und 2 Wochen nach dem SWT, im Vergleich zu 8 Wochen in BW |
| | | AP | Salzgehalt | ↓ | 20 Stunden nach dem SWT im Vergleich zu CD |
| | | CD | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *c4b* | Kiemen | CD | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *camp* | Kopfniere | Salzgehalt | | ↑ | 20 h +2 Wochen nach SWT, verglichen mit 8 Wochen in BW |
| | Kiemen | AP | Salzgehalt | ↓ | 20 Stunden nach dem SWT im Vergleich zu CD |
| *cat* | Kiemen | CV14 | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | | CD | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *ccl4* | Kopfniere | CD | PAA | ↓ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *cd28* | Kopfniere | CD | PAA | ↓ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *cd4* | Kiemen | CD | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *cebpb* | Kiemen | CV14 | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | | CD | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *clra* | Kiemen | AP | Salzgehalt | ↓ | 20 Stunden nach SWT im Vergleich zu CD |
| | | CV14 | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | | CD | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *cxcl8a* | CHSE-214 Zellen | Zymosan | | ↑ | |
| *drtp1* | Vorderer Teil des Darms | CVB | | ↑ | Bei 8 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| | Kopfniere | Salzgehalt | | ↑ | 20 Stunden nach dem SWT, verglichen mit 8 Wochen in BW |
| | Kiemen | CV14 | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | | CD | PAA | ↑ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *fcgr1a* | Kiemen | Salzgehalt | | ↓ | 20 Stunden nach dem SWT, verglichen mit 8 Wochen in BW |
| | Kopfniere | CV14 | PAA | ↓ | Im Vergleich zu vor PAA |

*AP (A. platensis 8% täglich); CD (Kontrolldiät); CV14 (C. vulgaris 14% täglich); CV14w (C. vulgaris 14% einmal wöchentlich); CV2 (C. vulgaris 2% täglich); CVB (C. vulgaris gebrochen 8% täglich); CVI (C. vulgaris unversehrt 8% täglich); h (Stunden; PAA (Peressigsäure); SWT (Meerwassertransfer); TC (T. chuii 8% täglich)*

Fortführung Tabelle 5

| Bioindikator | Gewebe | Behandlung | | Richtung | Effekt-Spezifikationen |
|---|---|---|---|---|---|
| Genbasierte Indikatoren | | | | | |
| *hamp* | Kiemen | Salzgehalt | | ⇩ | 20 h + 2 Wochen nach SWT, verglichen mit 8 Wochen in BW |
| *hsp1a1* | Kiemen | CV14 | PAA | ⇩ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *hspa5* | Kopfniere | CD | PAA | ⇩ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | | CV14 | PAA | ⇩ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *ier2-2* | Kopfniere | CV14w | | ⬆ | Zu beiden Zeitpunkten, verglichen mit CD |
| | | CD | PAA | ⇩ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | Kiemen | CD | PAA | ⬆ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *ifit5* | Kopfniere | Salzgehalt | | ⇩ | 2 Wochen nach SWT, verglichen mit 8 Wochen in BW |
| | | CV14 | PAA | ⇩ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | Kiemen | CD | PAA | ⬆ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | | Salzgehalt | | ⇩ | 2 Wochen nach SWT, verglichen mit 8 Wochen in BW |
| *ifn2a* | Kopfniere | CD | PAA | ⇩ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *ikba nfkbia* | Kiemen | CV14 | PAA | ⬆ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | | CD | PAA | ⬆ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | CHSE-214 Zellen | Zymosan | | ⬆ | |
| *il10rb* | Vorderer Teil des Darms | CVI | | ⇩ | 8 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| | | TC | | ⇩ | Bei 8 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| *il18* | Kopfniere | CD | PAA | ⇩ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | | CV14w | PAA | ⇩ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | | CV14 | PAA | ⇩ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | Kiemen | CD | PAA | ⬆ | Im Vergleich zu vor PAA |
| *il1b* | Kiemen | Salzgehalt | | ⇩ | 20 h + 2 Wochen nach SWT, verglichen mit 8 Wochen in BW |
| | CHSE-214 Zellen | Zymosan | | ⬆ | |
| *il1r2* | Vorderer Teil des Darms | CVI | | ⇩ | 8 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| *isg15* | Kiemen | Salzgehalt | | ⇩ | 2 Wochen nach der SWT, verglichen bis 8 Wochen in BW |
| | Kopfniere | Salzgehalt | | ⇩ | 2 Wochen nach SWT, verglichen mit 8 Wochen in BW |
| *lao1* | Kiemen | CV14 | PAA | ⬆ | Im Vergleich zu vor PAA |
| | Kopfniere | Salzgehalt | | ⇩ | 2 Wochen nach SWT, verglichen mit 8 Wochen in BW |
| *lyzc2* | Leber | TC | | ⬆ | 8 Wochen in BW, verglichen mit CD |
| *marco* | Kiemen | CV14 | PAA | ⬆ | Im Vergleich zu vor PAA |

## Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die Ergebnisse des TP1-Projektes mündeten in einer kumulativen Promotionsarbeit sowie verschiedenen Publikationen in Q1-Journalen mit Peer-Review-Verfahren. In diesen Arbeiten sind die Projektergebnisse detailliert dargestellt und auf zukünftige notwendige Forschung für einen Transfer der identifizierten Marker und vorgeschlagenen Bioindikatoren für Stress in der Aquakultur von Lachsen wird darin hingewiesen.
Die im Projekt neu entwickelten und zum Teil aus der Literatur entnommenen und verifizierten putativen Biomarker wurden teilweise bereits vorher seitens des FBN in anderen Analysen zur Gesundheit des Atlantischen Lachses genutzt, insbesondere in Zusammenarbeit mit der norwegischen Aquakultur. Das FBN arbeitet z.B. bereits seit mehr als 10 Jahren mit der norwegischen Firma NOFIMA wissenschaftlich zusammen. Publizierte Stressanalysen zum Atlantischen Lachs sind aufgrund der hohen wirtschaftlichen Bedeutung der Fischart viel gelesen und die Ergebnisse daraus werden für die Lachsproduktion genutzt. Im Sinne der weiteren Verwertung der Ergebnisse auch in Deutschland wäre ein Transfer in die deutsche Aquakulturproduktion von Lachsen und auch vergleichend bei anderen Salmoniden, wie Regenbogenforelle oder Ostseemaräne möglich. Auf wissenschaftlicher Ebene werden basierend auf den vorliegenden Ergebnissen weiterführende Drittmittelprojekte geplant.

## Wissenschaftskommunikation – Publikationen, Öffentlichkeit

Im Rahmen des TP1 wurden unter Beteiligung des FBN 6 Publikationen im Peer Review-Verfahren publiziert. Es wurden 9 nationale bzw. internationale Vorträge zur Thematik halten und ebenso 7 Poster auf nationalen und internationalen Tagungen vorgestellt (Liste im Folgenden).
Weiterhin erfolgte im Projektverlauf ein aktiver Transfer der wissenschaftlichen Erkenntnisse über die Implementierung von Projektdaten in die Ausbildung und Lehre im Masterstudiengang Aquakultur der Universität Rostock.
Im Rahmen von BioFiA fanden monatliche Meetings für den internen Wissenstransfer statt, die gewährleisteten, dass alle Partner in regelmäßigem wissenschaftlichen Austausch standen. Die Meetings wurden wechselseitig vom FBN oder der Universität Kiel moderiert und fanden in der Mehrzahl Online statt.

| | **Publikationen Peer Review** |
|---|---|
| **1** | van Muilekom DR, Collet B, Rebl H, Zlatina K, Sarais F, Goldammer T, Rebl A (2023). Lost and Found: The Family of NF-κB Inhibitors Is Larger than Assumed in Salmonid Fish. Int J Mol Sci 24(12), 10229. doi.org/10.3390/ijms241210229. |
| **2** | Mueller J, Pauly M, Molkentin J, Ostermeyer U, van Muilekom DR, Rebl A, Goldammer T, Lindemeyer J, Schultheiß T, Seibel H and Schulz C (2023). Microalgae as functional feed for Atlantic salmon: effects on growth, health, immunity, muscle fatty acid and pigment deposition. Front Mar Sci 10 20231. DOI:10.3389/fmars.2023.1273614. |
| **3** | van Muilekom D, Collet B, Rebl H, Zlatina K, Sarais F, Goldammer T, Rebl A (2023). Regulators of NF-κB activation: characterisation of the large NF-κB inhibitors family in salmonid fish. Dev Comp Immunol 148, 104996 (Abstract). |
| **4** | van Muilekom DR, Mueller J, Lindemeyer J, Schultheiß T, Maser E, Seibel H, Rebl A, Schulz C, Goldammer T (2024). Salinity change evokes stress and immune responses in Atlantic salmon with microalgae showing limited potential for dietary mitigation. Front Physiol 15:1338858. doi:10.3389/fphys.2024.1338858. |
| **5** | Mueller J, van Muilekom DR, Ehlers J, Suhr M, Hornburg SC, Bang C, Wilkes M, Schultheiß T, Maser E, Rebl A, Goldammer T, Seibel H, Schulz C (2024). Dietary Chlorella vulgaris supplementation modulates health, microbiota and the response to oxidative stress of Atlantic salmon. Sci Rep 14, 23674. doi.org/10.1038/s41598-024-72531-8. |

6 van Muilekom D (2024). Bioindicators to evaluate welfare status of Atlantic salmon Salmo salar under changing farming conditions and the potential of microalgae-enriched diets. Promotionsarbeit pp 152, kumulativ, Universität Rostock.

## Konferenzbeiträge

### Vorträge

1 van Muilekom D, Mueller J, Schlachter M, Brunner RM, Seibel H, Starke S, Rebl A, Goldammer T (2022). Transcriptomic profiling of the stress and immune response in Atlantic salmon Salmo salar to salinity change and microalgae diets. Symposium der Blauen Bioökonomie, Stralsund, Germany

2 van Muilekom D, Mueller J, Schlachter M, Brunner RM, Seibel H, Starke S, Rebl A, Goldammer T (2022). The effect of salinity change and its dietary mitigation potential using microalgae on the immune and stress response of Atlantic salmon Salmo salar. FBN-PhD-Studentenseminar, Dummerstorf, Germany.

3 van Muilekom D (2023). It's getting salty – Microalgae diet effects on salmon. Symposium der Blauen Bioökonomie, Oldenburg, Germany.

4 van Muilekom D, Mueller J, Schlachter M, Brunner RM, Seibel H, Rebl A, Goldammer T (2022). The transcriptomic response of Atlantic salmon Salmo salar to microalgae diets and environmental stress. Aquaculture Europe 2022, Rimini, Italy.

5 van Muilekom D, Collet B, Rebl H, Zlatina K, Sarais F, Goldammer T, Rebl A (2023). Regulators of NF-κB activation: characterisation of the large NF-κB inhibitors family in salmonid fish.ISDCI 15th Congress - International Society of Developmental and Comparative Immunology, Wageningen, Netherlands.

6 Doret van Muilekom et al. (2023). Fighting threats with many others: Charachterisation of the large NF- κB inhibitors family in salmonid fish. Aquaculture Europe 2023, Vienna, Austria.

7 Mueller J, van Muilekom D, Ehlers J, Rebl A, Goldammer T, Seibel H, Schulz C (2023). MODE OF APPLICATION OF A FUNCTIONAL FEED DETERMINES THE IMMUNE RESPONSE OF ATLANTIC SALMON TOWARDS ACUTE OXIDATIVE STRESS. Aquaculture Europe 2023, Vienna, Austria.

8 Doret van Muilekom et al. (2023). Effect of microalgae in feed on the health status of Atlantic salmon under stress. FBN-Kolloquium, Dummerstorf, Germany.

9 Doret van Muilekom et al. (2023). Effect of microalgae as functional feed on the immune status of stressed Atlantic salmon. FBN-PhD-Studentenseminar, Dummerstorf, Germany.

### Poster

1 Goldammer T, Rebl A, Brunner RM, van Muilekom R, Starke S, Ewald D, Kübler A, Apel J, Molkentin J, Ostermeyer U, Knappe A, Spieck E, Keuter S, Malinowski M, Fuentes J, Unger P, Schlachter M, Müller J, Seibl C, Schulz C (2021). BIOINDICATORS FOR THE EVALUATION OF FISH FARMING, HEALTH AND PRODUCT QUALITY IN AQUACULTURE (BIOFIA). Aquaculture Europe 2021, Madeira, Spain.

2 van Muilekom D, Mueller J, Schlachter M, Brunner RM, Seibel H, Rebl A, Goldammer T (2021). THE TRANSCRIPTOMIC RESPONSE OF ATLANTIC SALMON Salmo salar TO MICROALGAE DIETS AND ENVIRONMENTAL STRESS. Aquaculture Europe 2021, Madeira, Spain.

3 Ewald D, van Muilekom D, Mueller J, Starke S, Seibel H Schlachter M, Schulz C, Goldammer T (2021). BIOINDICATORS FOR THE EVALUATION OF FISH FARMING, HEALTH AND PRODUCT QUALITY IN DIFFERENT AQUACULTURE SYSTEMS (BIOFIA). Aquaculture Europe 2021, Madeira, Spain.

4 van Muilekom D, Mueller J, Schlachter M, Brunner RM, Seibel H, Starke S, Rebl A, Goldammer T (2022). Untersuchungen zum Einfluss von Mikroalgen auf die Expression von Immun- und Stressgenen des Atlantischen Lachses Salmo salar bei unterschiedlichen Salinitäten. Deutscher Fischereitag 2022, Berlin, Germany.

| | |
|---|---|
| **5** | Goldammer et al. – Projektkonsortium (2023). BioFiA - Bioindikatoren für die Haltung, Gesundheit und Produktqualität von Fischen in der Aquakultur. Symposium der Blauen Bioökonomie, Oldenburg, Germany. |
| **6** | Goldammer et al. – Projektkonsortium (2023). BIOFIA - BIOINDICATORS FOR THE FARMING, HEALTH, AND PRODUCT QUALITY OF FISH IN AQUACULTURE Aquaculture Europe 2023, Vienna, Austria (2023). |
| **7** | Goldammer et al. – Projektkonsortium (2024). BioFiA - Bioindikatoren für die Haltung, Gesundheit und Produktqualität von Fischen in der Aquakultur. Symposium der Blauen Bioökonomie, Kiel, Germany. |

## Allgemeine Angaben zur Verwendung der Zuwendung

**Personal im BaMS-BioFiA TP1**

Im Projekt erfolgte die Einstellung einer wissenschaftlichen Mitarbeiterin, namentlich Frau Doret R. van Muilekom. Die Personalstelle war vom 01.11.2020 bis zum 30.04.2024 besetzt. Im Rahmen der Beschäftigung war eine Qualifizierung (Promotion) möglich. Diese wurde am 18.10 2024 verteidigt und erfolgreich abgeschlossen.

**Sachmittel im BaMS-BioFiA TP1**

Während der Projektlaufzeit wurden zahlreiche Laborexperimente durchgeführt, für die ein Teil der Sachmittel eingesetzt wurde. Genau Zahlen sind dem Verwaltungsbericht zum Projekt zu entnehmen. Alle Experimente sind über die vereinheitlichte Laborbuchführung im FBN verifizierbar und wurden entsprechend der Regeln zu guter wissenschaftlicher Praxis im FBN archiviert.

Während der Projektlaufzeit fanden eine Reihe von Dienstreisen statt. Dies entweder für Experimente und Probennahmen, Projektmeetings, Konferenzen im Rahmen von BaMS bzw. der Blauen Bioökonomie sowie zur Teilnahme an nationalen oder internationalen Konferenzen. Die Teilnahme an Konferenzen war immer auch mit der Präsentation von Ergebnissen verbunden (siehe Publikationen). Im Projektzeitraum waren darüber hinaus Dienstreisen an Aquakulturstandorte in Norwegen bzw. Großbritannien geplant, die gemeinsam mit dem Schwesterprojekt SensoFiA erfolgen sollten. Nur eine Reise davon wurde aufgrund der Pandemie realisiert.

## Danksagung

Wir danken der dem Innovationsraum Bioökonomie an Marinen Standorten und dem BMBF für die Förderung und das uns entgegengebrachte Vertrauen in den Erfolg des Projektes.

# ANHANG

## Im Bericht verwendete Literatur

Aly SM, ElBanna NI, Fathi M (2023) Chlorella in aquaculture: challenges, opportunities, and disease prevention for sustainable development. Aquac Int 2:1559–1586. doi:10.1007/s10499-023-01229-x.

Borchel A, Komisarczuk AZ, Rebl A, Goldammer T, Nilsen F (2018) Systematic identification and characterization of stress-inducible heat shock proteins (HSPs) in the salmon louse (Lepeophtheirus salmonis). Cell Stress Chaperones 23(1):127-139. doi: 10.1007/s12192-017-0830-9.

Carletto D, Furtado F, Zhang J, Asimakopoulos AG, Eggen M, Verstege GC, Faggio C, Mota VC, Lazado CC (2022). Mode of application of peracetic acid-based disinfectants has a minimal influence on the antioxidant defences and mucosal structures of Atlantic salmon (Salmo salar) parr. Front. Physiol. 13, 1–18. DOI: 10.3389/fphys.2022.900593.

Eslamloo K, Xue X, Booman M, Smith NC, Rise ML (2016). Transcriptome profiling of the antiviral immune response in Atlantic cod macrophages. Developmental and Comparative Immunology 63, 187–205. doi.org/10.1016/j.dci.2016.05.021.

Gomez D, Sunyer JO, Salinas I (2013). The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. Fish Shellfish Immunol 35(6):1729-39. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.032.

Hüpeden J, Wemheuer B, Indenbirken D, Schulz C, Spieck E (2020) Taxonomic and functional profiling of nitrifying biofilms in freshwater, brackish and marine RAS biofilters. Aquacult Eng 90, 102094, 10.1016/j.aquaeng.2020.102094.

Hussein HJ, Naji SS, Al-Khafaji, NMS (2018). Antibacterial properties of the Chlorella vulgaris isolated from polluted water in Iraq. J Pharm Sci Res 10, 2457–2460.

Kajita Y, Kobayashi M, Kawauchi H (1992). Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout Oncorhynchus mykiss injected with growth hormone. Fish & Shellfish Immunology, 9, 155–157. doi.org/10.1016/S1050- 4648(05)80044-0.

Kaleo IV, Gao Q, Liu B, Sun C, Zhou Q, Zhang H, Shan F, Xiong Z, Bo L, Song C (2019). Effects of Moringa oleifera leaf extract on growth performance, physiological and immune response, and related immune gene expression of Macrobrachium rosenbergii with Vibrio anguillarum and ammonia stress. Fish and Shellfish Immunology 89(9), 603–613. doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.039.

Korytar T, Nipkow M, Altmann S, Goldammer T, Köllner B, Rebl A (2016). Adverse husbandry of maraena whitefish directs the immune system to Increase mobilization of myeloid cells and proinflammatory responses. Front Immunol 7:631. doi: 10.3389/fimmu.2016.00631.

Krasnov, A., Afanasyev, S., Nylund, S., & Rebl, A. (2020). Multigene expression assay for assessment of the immune status of Atlantic Salmon. Genes, 11(1236). doi.org/https://doi.org/10.3390/genes11111236.

Krüger M, Richter P, Strauch SM, Nasir A, Burkovski A, Antunes CA, Meißgeier T, Schlücker E, Schwab S, Lebert M (2019). What an escherichia coli mutant can teach us about the antibacterial effect of chlorophyllin. Microorganisms 7 (2):59. doi:10.3390/microorganisms7020059.

Michl SC, Beyer M, Ratten JM, Hasler M, LaRoche J, Schulz C (2019). A diet-change modulates the previously established bacterial gut community in juvenile brown trout (Salmo trutta). Sci Rep 9(1):2339. doi:10.1038/s41598-019-38800-7.

Molkentin J, Lehmann I, Ostermeyer U, Rehbein H. Traceability of organic fish - Authenticating the production origin of salmonids by chemical and isotopic analyses. Food Control. 2015; 53:55-66. doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.003.

MonitorFisH GmbH (2019). monitorfish.com/

Montero R, Strzelczyk JE, Chan JTH, Verleih M, Rebl A, Goldammer T, Köllner B, Korytář, T (2020). Dawn to dusk: Diurnal rhythm of the immune response in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Biology, 9(1), 1–13. doi.org/10.3390/biology9010008.

Mueller J, Pauly M, Molkentin J, Ostermeyer U, van Muilekom DR, Rebl A, Goldammer T, Lindemeyer J, Schultheiß T, Seibel H and Schulz C (2023) Microalgae as functional feed for Atlantic salmon: effects on growth, health,

immunity, muscle fatty acid and pigment deposition. Front Mar Sci 10 20231. DOI:10.3389/fmars.2023.1273614.

Mueller J, van Muilekom DR, Ehlers J (2024). Dietary Chlorella vulgaris supplementation modulates health, microbiota and the response to oxidative stress of Atlantic salmon. Sci Rep 14, 23674. doi.org/10.1038/s41598-024-72531-8

Nipkow M, Wirthgen E, Luft P, Rebl A, Hoeflich A, Goldammer T (2018). Characterization of igf1 and igf2 genes during maraena whitefish (Coregonus maraena) ontogeny and the effect of temperature on embryogenesis and igf expression. Growth Horm IGF Res 40:32-43. doi:10.1016/j.ghir.2018.04.003.

Raposo de Magalhães CSF, Cerqueira MAC, Schrama D, Moreira MJV, Boonanuntanasarn S, Rodrigues PML (2020). A Proteomics and other Omics approach in the context of farmed fish welfare and biomarker discovery. Reviews in Aquaculture, 12(1), 122–144. doi.org/10.1111/raq.12308.

Rebl A, Goldammer T (2018) Under control: The innate immunity of fish from the inhibitors' perspective. Fish Shellfish Immunol 77:328-349. doi:10.1016/j.fsi.2018.04.016.

Rebl A, Korytář T, Borchel A, Bochert R, Strzelczyk JE, Goldammer T, Verleih M (2020). The synergistic interaction of thermal stress coupled with overstocking strongly modulates the transcriptomic activity and immune capacity of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Sci Rep 10(1):14913. doi: 10.1038/s41598-020-71852-8.

Rebl A, Verleih M, Nipkow M, Altmann S, Bochert R, Goldammer T. (2018) Gradual and acute temperature rise induces crossing endocrine, metabolic, and immunological pathways in maraena whitefish (Coregonus maraena). Front Genet 9:241. doi:10.3389/fgene.2018.00241.

Sakai M, Kobayashi M, Kawauchi H (1996). In vitro activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. Journal of Endocrinology, 151(1), 113–118. doi.org/https://doi.org/10.1677/joe.0.1510113.

Seibel H, Baßmann B, Rebl A (2021). Blood Will Tell: What Hematological Analyses Can Reveal About Fish Welfare Front Vet Sci 8: 616955. doi:10.3389/fvets.2021.616955.

Sood N, Verma DK, Paria A, Yadav SC, Yadav MK, Bedekar MK, Kumar S, Swaminathan TR, Mohan CV, Rajendran KV, Pradhan PK (2021). Transcriptome analysis of liver elucidates key immune-related pathways in Nile tilapia Oreochromis niloticus following infection with tilapia lake virus. Fish and Shellfish Immunology, 111, 208–219 doiorg/101016/jfsi202102005.

Swirplies F, Würtz S, Baßmann B, Orban A, Schäfer N, Brunner RM, Hadlich F, Goldammer T, Rebl A (2019). Identification of molecular stress indicators in pikeperch Sander lucioperca correlating with rising water temperatures. Aquaculture 501: 260-271. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.043.

Unger P, Palm HW (2017) Parasite risk of maricultured rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792) in the Western Baltic Sea, Germany. Aquaculture International 25, 975-989. doi:10.1007/s10499-016-0096-8.

van Muilekom DR, Collet B, Rebl H, Zlatina K, Sarais F, Goldammer T, Rebl A (2023). Lost and Found: The Family of NF-κB Inhibitors Is Larger than Assumed in Salmonid Fish. International Journal of Molecular Sciences, 24(12). doi.org/10.3390/ijms241210229.

Wang W, Hu J, Fu Z, Yu G, Ma Z (2022). Daily Rhythmicity of Hepatic Rhythm, Lipid Metabolism and Immune Gene Expression of Mackerel Tuna (Euthynnus affinis) under Different Weather. Journal of Marine Science and Engineering, 10(12). doi.org/10.3390/jmse10122028.

World Health Organization (1993). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm#SectionNumber:1.1.

Zhang C, Jiang D, Wang J, Qi Q (2021). The effects of TPT and dietary quercetin on growth, hepatic oxidative damage and apoptosis in zebrafish. Ecotoxicology and Environmental Safety, 224, 112697. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112697.