

ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN
DEPARTEMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT
INSTITUT FÜR UMWELT UND NATÜRLICHE RESSOURCEN

**Einfluss von Mikroalgen-Fütterung auf das Wachstum und die Gesundheit von Tilapia
(*Oreochromis niloticus*)**

Bachelorarbeit

von

Andreas Seitz

Bachelorstudiengang 2014

Umweltingenieurwesen

Abgabedatum 07.09.2017

Fachkorrektoren:

Dr. Pietsch-Schmied, Constanze
ZHAW, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen, 8820 Wädenswil

Tschudi, Fridolin
ZHAW, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen, 8820 Wädenswil

Impressum

Schlagworte:

Oreochromis niloticus, Histologie, Milz, Leber, Fütterungsexperiment, Fischgesundheit

Zitiervorschlag:

Seitz, A. (2017). Einfluss von Mikroalgen-Fütterung auf das Wachstum und die Gesundheit von Tilapia (*Oreochromis niloticus*). (Bachelorarbeit). ZHAW Life Sciences und Facility Management, Wädenswil.

Adresse des Instituts:

ZHAW Life Sciences und Facility Management

Grüntalstrasse 14

8820 Wädenswil

Zusammenfassung

In Aquakulturen können verschiedenste Einflüsse die Fischgesundheit beeinträchtigen, wobei sich die Histopathologie dazu eignet, den Gesundheitszustand von Fischen zu eruieren. Die Leber und die Milz erfüllen beide wichtige Funktionen in Fischen und können als Indikatororgane zur Erfassung der Fischgesundheit dienen. In der Milz, als wichtiges lymphatisches Organ, kommen Makrophagen-Aggregate (MAs) vor. Ihre Häufigkeit, ebenso wie der Zustand der Leberstruktur, reagieren auf verschiedenste Einflüsse und Haltungszustände. In der vorliegenden Arbeit soll der Gesundheitszustand von juvenilen Tilapias (*Oreochromis niloticus*), denen innerhalb eines 9-wöchigen Fütterungsexperiments zwei mikroalgenhaltige Futtermittel (Nanno/Porph und Iso/Nanno), sowie ein Kontrollfutter gefüttert wurde, erhoben werden. Dies geschieht anhand einer digitalen Auswertung von histologischen Präparaten der Leber und der Milz. Diese Resultate werden weiterhin mit weiteren Daten des Fütterungsexperiments verglichen.

Von sechs Fischen pro Fütterungsgruppe wurden mehrere 4 µm dicke Abschnitte beider Organe auf Objektträgern fixiert und mit der H.E.-Färbung eingefärbt. Von repräsentativen Ausschnitten der jeweiligen Organschnitte wurden Fotos unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Flächen der Makrophagen-Aggregate der Milz wurden anhand von ImageJ quantifiziert. Der Leberzustand der Versuchsfische wurde anhand einer Bewertungsskala, welche von 0 = keine Veränderung bis 3 = starke Veränderung reicht, erhoben und damit allfällige Veränderungen quantifiziert. Zusätzliche Daten beinhalteten den Hepatosomatischen Index (HSI), den Splenosomatischen Index (SSI), Wachstumsraten, den Analysebericht zu den Nährstoffgehalten der Versuchsfutter sowie den Fettgehalt der Versuchsfische.

Die histopathologische Bewertung der Leber zeigte, dass ein Grossteil der Fischlebern verfettet war. Die Bewertung ergab 2.63 beim Kontrollfutter, 2.40 beim Futter Iso/Nanno und 2.37 beim Futter Nanno/Porph. Die grösste Fläche der MAs konnte in der Milz der Fische, die das Kontrollfutter erhielten, nachgewiesen werden. Der Flächenanteil lag dort bei 0.61 %, beim Futter Nanno/Porph bei 0.57 % und beim Futter Iso/Nanno bei 0.24 %. Der HSI war bei allen Versuchsfütterungen erhöht. Der SSI war am höchsten bei den Fischen, die algenhaltiges Futter erhielten, ebenso der Fettgehalt. Dennoch wuchsen Fische, die algenhaltiges Futter erhielten, signifikant besser, als die Fische die das Kontrollfutter erhielten.

Insgesamt scheinen die verwendeten Mikroalgen gut für die Fischfutterherstellung geeignet zu sein. Die Resultate der histopathologischen Bewertungen decken sich mit den guten Wachstumsraten, was den Schluss zulässt, dass die Versuchsfische in guter Verfassung sind und trotz verfetteter Lebern keinen krankhaften Zustand aufweisen. Der HSI könnte aufgrund eines Energieüberschusses im Futter erhöht vorliegen, was auch die verfetteten Lebern erklären würde. Der SSI könnte auf ein erhöhtes Stresslevel der Fische hinweisen. Diesbezüglich wären weitere Untersuchungen notwendig.

Abstract

In aquaculture, different influences can affect the health of the fish. Histopathology is suitable to determine the fish's health. Both the liver and the spleen fulfill essential functions in fish and can serve as indicator organs for fish health assessment. In the spleen, an important lymphatic organ, macrophage aggregates (MAs) occur. The frequency, as well as the conditions of the liver structure, react to various influences and fish farming conditions. The work presented examines the health of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during a 9-week feeding trial. They were fed two feeds containing microalgae (Nanno/Porph and Iso/Nanno) as well as a control feed. This is done by means of a digital evaluation of histological preparations of the liver and the spleen. The obtained results are then compared with further data obtained from the feeding trial.

Several 4 µm thick sections were cut from both organs in six fish per feeding test group, were fixed on slides, and stained with H.E. staining. Photos were taken of representative sections under the light microscope at 100x magnification. The area of the macrophage aggregates of the spleen was quantified using ImageJ. The conditions of the liver in the test fish were evaluated with the utilization of an assessment scale – ranging from 0 = no change to 3 = severe change - to quantify apparent shifts in the liver tissue. Additional data included the hepatosomatic index (HSI), the splenosomatic index (SSI), growth rates, the nutritional analysis of the trial feeds, and the fat content of the trial fish.

The histopathological assessment of the liver showed that a significant portion of the fish had fatty livers. The valuation was 2.63 for the control feed, 2.40 for the Iso/Nanno and 2.37 for the Nanno/Porph. The largest area of the MAs could be detected in the spleen of fish that received the control feed and measured 0.61 %. The Nanno/Porph feed revealed a share of 0.57 % and the Iso/Nanno feed 0.24 %. The HSI was increased in all test feeds. The SSI was highest among the fish receiving feed containing algae, as was the fat content. Nevertheless, fish that received algae-rich feed grew significantly better than the fish fed the control feed.

Overall, the microalgae seem to be well suited for the production of fish feed. The results of the histopathological evaluations coincide with the favorable growth rates, which leads to the conclusion that the experimental fish are healthy and do not show any diseased state, despite the fatty liver. The HSI could be increased due to an energy surplus in the feed, which would also explain the fatty liver. The SSI could point to an increased stress level of the fish. In this regard, further investigations would be necessary in order to clarify the health status of the fish more in detail.

Danksagung

Einen ganz herzlichen Dank möchte ich an Constanze Pietsch-Schmied für die fundierte Unterstützung, für die geleisteten Korrekturen, sowie für die zur Verfügung gestellten Daten aussprechen. Ebenso grosser Dank gilt Sophia Egloff, für ihr Vertrauen, dass ich an allen Teilen des Fütterungsexperiments teilhaben durfte. Gleichermassen danke ich ihr für die geleistete Unterstützung und für die zur Verfügung gestellten Daten. Weiteren Dank gilt Fridolin Tschudi für die hilfreichen Inputs und Korrekturen. Zuletzt danke ich meiner Mutter, Alexa Seitz, für die Hilfestellung bei der sprachlichen Korrektur dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
2	Theorie	9
3	Material und Methoden	11
3.1	Fütterungsexperiment.....	11
3.2	Histologie.....	13
3.2.1	Fotos von Histologiepräparaten (Milz und Leber).....	13
3.2.2	Bearbeitung der Fotos	13
3.2.3	Histopathologische Bewertung der Milz	14
3.2.4	Histopathologische Bewertung der Leber.....	16
3.3	Statistische Analyse.....	18
4	Resultate	19
4.1	Fütterungsexperiment.....	19
4.1.1	Fettgehalt der Versuchsfische und Versuchsfutter	19
4.1.2	Berechnete Wachstumsraten und Wachstumskurven	20
4.1.3	Organosomatische Indizes (HSI und SSI).....	21
4.2	Histopathologische Bewertung der Milz	21
4.3	Histopathologische Bewertung der Leber.....	24
5	Diskussion	26
6	Schlussfolgerung	31
7	Literaturverzeichnis.....	32
	Abbildungsverzeichnis	38
	Tabellenverzeichnis	40
	Anhang	41
	Poster	51

1 Einleitung

Seit 1960 hat der weltweite Fischkonsum pro Kopf stetig zugenommen. Damals lag der durchschnittliche Konsum bei 9.9 kg, während Schätzungen für die letzten drei Jahre einen Konsum von über 20 kg voraussagten. In 2014 konnten zum ersten Mal mehr Fische durch Aquakulturen für den menschlichen Verzehr bereitgestellt werden als durch Wildfänge. Modellvoraussagen zufolge wird die steigende Nachfrage nach Fisch bis 2025 mehrheitlich durch Aquakulturen gedeckt werden. Damit bleibt der Aquakultursektor einer der am schnellst wachsenden Sektoren für die Produktion tierischer Lebensmittel (FAO, 2016).

Fischmehl ist ein wesentlicher Bestandteil von Aquakultur-Futtermitteln. Wegen seines hohen Proteingehalts dient es als gute Proteinquelle; ebenso beinhaltet es viele Aminosäuren, essentielle Fettsäuren und Mineralstoffe. Wegen den steigenden Nachfragen und Kosten werden jedoch immer mehr Versuche unternommen, um das Fischmehl teilweise oder vollständig in Fischfuttermitteln für verschiedenste Aquakulturarten zu ersetzen (Lim & Webster, 2006). Fischöl gehört ebenso zu den nahrhaftesten und verträglichsten Futterbestandteilen der Zuchtfische (FAO, 2016), wobei nach Jackson (2012) die Notwendigkeit für Fischfutterproduzenten und Fischzüchter darin besteht, zu zeigen, dass die Rohmaterialien, welche sie in ihren Futtern verwenden, aus nachhaltigen Quellen stammen. Ebenso müssen gemäss Obach (2012) die Futtermittelproduzenten Alternativen für Fischmehl und Fischöl finden, dabei jedoch die Fischgesundheit gewährleisten und die Produktionsleistung von Aquakulturen aufrechterhalten. Algen (Mikro- und Makroalgen) könnten wiederum als Alternative dienen, Fischmehl im Fischfutter zu ersetzen (Henry, 2012).

In Aquakulturen haben verschiedene Faktoren einen Einfluss auf das Wohlergehen der Fische (Ashley, 2007). Fische haben sehr spezifische Ansprüche bezüglich ihrer aquatischen Umwelt. Sie sind sehr schnell gestresst, wenn diese Anforderungen nicht erfüllt werden. Als Konsequenz daraus kann ihre Gesundheit darunter leiden (Conte, 2004). Daher ist unter anderem eine adäquate Ernährung essentiell für eine gute Krankheitsprävention in Aquakulturen (Trichet, 2010).

Gemäss Johnson et al. (1993) stellt die Histopathologie eine nützliche und schnelle Methode dar, um negative, chronische Effekte verschiedenster schädlicher Einflüsse auf Gewebe und Organe zu eruieren. Verglichen mit Wachstumsparametern sind histologische Veränderungen schneller sichtbar und ebenfalls deutlich sensitiver. Zudem bieten sie eine bessere Übersicht über den Zustand einzelner Zellen oder den eines ganzen Gewebes als die blosse Messung eines einzelnen biochemischen Parameters (Segner & Braunbeck, 1988). Nebst der Erfassung der Wirkung von Schadstoffen können histopathologische Biomarker auch für die Beurteilung des Gesundheitszustandes von Fischen genutzt werden (Handy et al., 2002). Bei Ernährungsstudien an Fischen schlagen Segner & Braunbeck (1988) die Verwendung der Leber als Indikatororgan vor. Auch Bernet et al. (1999) verwenden in ihrer Methode zur Bewertung und Quantifizierung von histologischen Läsionen, verursacht durch Schadstoffe, die Leber als Markerorgan. Ebenfalls

empfehlen Handy et al. (2002) die Histopathologie der Leber als Biomarker zur Kontrolle der Fischgesundheit. Eine Möglichkeit zur Einschätzung des Organzustandes besteht ebenfalls in der Beobachtung der Häufigkeit von Makrophagen in den Geweben, Makrophagen sind bei Echten Knochenfischen Bestandteil des zum Immunsystem gehörenden Gewebes (Press & Evensen, 1999). Die Pigmente der Makrophagen-Aggregate (Hämosiderin, Melanin und Ceroid/Lipofuszin) sind dabei gut unter dem Lichtmikroskop anhand von histochemischen Methoden sichtbar (Wolke et al., 1985). Makrophagen-Aggregate (MAs) oder auch Melanomakrophagen Zentren (MMC) (Wolke, 1992), können nach Fournie et al. (2001) durch Unterschiede in ihrer Häufigkeit auf Veränderungen des Gesundheitszustandes eines Fisches hinweisen. Dabei sind es vor allem die Milz MAs, welche als zuverlässige, histopathologische Bioindikatoren für die Fischgesundheit dienen.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein Fütterungsexperiment an Tilapia (*Oreochromis niloticus*) nach Egloff (2017) durchgeführt. Dabei wurden die Fische während neun Wochen mit drei verschiedenen Versuchsfuttern (Kontrollfutter, Futter Nanno/Porph und Futter Iso/Nanno) gefüttert. Diese Versuchsfutter wurden nach Seitz (2017) hergestellt, wobei versucht wurde, Teile des Fischmehls und Fischöls im Futter (Nanno/Porph und Iso/Nanno) durch Mikroalgen zu ersetzen, um die Fischfutterherstellung nachhaltiger zu gestalten.

In der nachfolgenden Arbeit wird der Gesundheitszustand von den Fischen eines Fütterungsexperiments erhoben. Dies soll anhand einer digitalen Auswertung von histologischen Präparaten der Leber und der Milz geschehen. Insbesondere soll dabei das Gewebe der Leber auf Veränderungen sowie das Vorkommen von MAs in der Milz untersucht werden. Dazu werden die vorhandenen Veränderungen in der Leber und die Flächen der MAs in der Milz quantifiziert. Anhand von statistischen Tests soll geprüft werden, ob Unterschiede betreffend Fischgesundheit zwischen den verschiedenen Versuchsfütterungen bestehen. Diese Resultate werden mit zusätzlich zur Verfügung gestellten Daten (Nährstoffdaten, Wachstumsraten und diverse organosomatische Indizes) verglichen. Dieser Vergleich soll Aufschluss darüber geben, wie verträglich die verschiedenen Versuchsfutter für Tilapia sind und ob ihre Gesundheit dadurch beeinträchtigt wurde, um so zu eruieren, ob die verwendeten Mikroalgen in der Fischfutterherstellung geeignet wären.

2 Theorie

Die Leber steuert mehrere Lebensfunktionen und spielt dabei als Schlüsselorgan eine sehr wichtige Rolle im Anabolismus und Katabolismus bei Wirbeltieren, einschliesslich der Fische. Ihre wichtigsten Funktionen sind dabei die Entgiftung, die Immunabwehr, die Bildung der Gallensäuren, die Speicherung (von Lipiden, Kohlenhydraten, Vitamin A und Eisen) sowie die Produktion von Vitellogenin (in weiblichen Fischen). Dabei kann durch Nahrung, Schadstoffe, Toxine, Parasiten und Mikroorganismen die Leberstruktur sowie ihr Metabolismus verändert werden (Bruslé & Anadon, 1996). Ein häufiges Problem, mit bedeutenden Auswirkungen in Fischzuchten, ist die hepatische Lipidakkumulation (Xu et al., 2012). Mehrere Ursachen dafür sind bekannt: Parasiten (Paperna, 1991), Toxine (Tanaka et al., 1999), Pestizide (Xu et al., 2012), sowie eine nicht angemessene Ernährung (Russell et al., 2001; Serrano et al., 1992). Ebenso hat die Leber Anteil am Blutumsatz sowie am Stickstoffkatabolismus (Bruslé & Anadon, 1996). Im Gegensatz zu höheren Wirbeltieren, sind jedoch gemäss Catton (1951) hauptsächlich die Niere und die Milz die hämatopoetischen Organe bei den Echten Knochenfischen. In manchen Fischen kann auch nur eines der beiden Organe, oder eines stärker als das andere, beteiligt sein.

Laut Homechaudhuri & Jha (2001) ist bei Tilapia (*Oreochromis niloticus*) die Milz jedoch geringfügig stärker an der Erythropoese beteiligt. Dazu ist die Milz auch noch der Ort, an dem alte rote Blutkörperchen sowie andere überalterte Blutzellen beseitigt werden (Fänge & Nilsson, 1985) und sie zählt bei den Echten Knochenfischen zu den wichtigsten lymphatischen Organen (Press & Evensen, 1999). Viele Organe der Fische zeigen ebenfalls Makrophagen-Aggregate. Den Makrophagen-Aggregaten werden dabei verschiedene Funktionen zugesprochen wie: der Speicherung von Eisen (Agius, 1979) und Phospholipiden (Agius & Agbede, 1984) nach zelleigener Phagozytose, sowie ihrer Rolle in der Immunabwehr bei Fischen (Lamers & De Haas, 1985). Daher kommen nach Wolke et al. (1985) Makrophagen-Aggregate hauptsächlich in der Leber, der Milz und Niere vor und sind ein wichtiger Bestandteil des Retikuloendothelialen Systems (RES) bei Fischen. Das RES umfasst dabei alle Zellen, welche einen Beitrag zur Entfernung von endogenen und exogenen Substanzen im Blut leisten (Aschoff, 1924). In der Literatur sind verschiedene Gründe für die Akkumulation und oder Häufung von Makrophagen-Aggregaten aufgeführt: so haben Alter (Blazer et al., 1987; Brown & George, 1985), Ernährungszustand (Agius & Roberts, 1981), sowie infektiösen Krankheiten (Vogelbein et al., 1987) allesamt einen Einfluss darauf. Auch verschiedene Umweltverschmutzungen können einen Einfluss auf die Anzahl der Makrophagen-Aggregate haben (Meinelt et al., 1997; Spazier et al., 1992).

Gemäss Wolke et al. (1985) ist ein gesunder Organismus in physiologischem Gleichgewicht mit seiner Umwelt. Die Krankheit dagegen führt zur Störung dieses Gleichgewichts, zur Störung der Homöostase und stört zugleich die Beziehung des Organismus zu seiner Umwelt. Anfänglich spielen

sich diese Ungleichgewichte auf biochemischer Ebene ab, bis sie schlussendlich häufig auch morphologisch sichtbar werden.

Histologische Veränderungen, als integrativer Parameter, geben dabei eine bessere Übersicht zum Gewebe- und Zellzustand als Einzelparameter (Segner & Braunbeck, 1988). Nebst histopathologischen Biomarkern zur Erfassung der Fischgesundheit (Handy et al., 2002) werden in Studien zur Beurteilung von Stress (Vijayan & Leatherland, 1988) und Umweltschadstoffen (Hinck et al., 2006) der Hepatosomatische Index (HSI) und der Splenosomatische Index (SSI) von Fischen beigezogen. Dabei werden diese organosomatischen Indizes als Indikatoren für die allgemeine Fischgesundheit angesehen (Dethloff & Schmitt, 2000; Hinck et al., 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Fütterungsexperiment

Das komplette Fütterungsexperiment wurde nach Egloff (2017) durchgeführt. Dabei wurden ungefähr 650 Tilapia-Fingerlinge (*Oreochromis niloticus*) von Til-Aqua, NE importiert und während 7 Tagen in einer Quarantäne akklimatisiert. Das Durchschnittsgewicht der Fingerlinge betrug 0.18 g und die Wassertemperatur der Quarantäne lag zwischen 25 und 26 °C. In den ersten 5 Tagen wurden die Fische mit kommerziellem Futter (Aller Futura Ex Gr. 0, Emsland Aller Aqua, Deutschland) gefüttert. Die nächsten zwei Tage wurden die Fische mit dem im Vorfeld nach Seitz (2017) hergestellten Kontrollfutter gefüttert, bevor das 9-wöchige Fütterungsexperiment begann.

Das Fütterungsexperiment lief unter der Tierversuchsgenehmigung zh213/16. Es wurde in drei unabhängigen Kreisläufen (Reihen), bestehend aus jeweils drei Rundstrombecken mit einem Wasservolumen von 1700 Litern, einem Trommelfilter, einem Biofilter, einer Sauerstoffanreicherung und einem Kühl- und Heizsystem durchgeführt. Das Individualgewicht der Fische zu Beginn des Experiments betrug 0.260 ± 0.004 g. Vor dem Einsetzen der Fische in die Becken wurden alle gewogen, um ein möglichst identisches Gewicht der Fischbiomasse über alle Versuchsreihen zu erreichen. Die Biomasse lag dann in allen Becken bei 10.40 ± 0.17 g. Pro Versuchsreihe wurden 120 Tilapias (*Oreochromis niloticus*) eingesetzt, was einer Gesamtzahl von 360 Tilapias, mit 40 Individuen pro Becken, entsprach. In den Rundbecken wurden die Fische zuerst in Netzkörben mit einer Maschenweite von 1.4 mm x 2.2 mm und einem Volumen von 40 Litern gehalten. Nach 4 Wochen wurden die Fische in grössere Netzkörbe mit einem Volumen von 170 Litern und einer Maschenweite von 5 mm x 5 mm umgesiedelt (Egloff, 2017).

Die Versuchsfutter, welche bei dem Experiment zum Einsatz kamen, wurden zuvor nach Seitz (2017) hergestellt. Insgesamt wurden drei verschiedene Fischfutter entwickelt. Ein Kontrollfutter, welches einem kommerziellen Fischfutter entsprechen sollte, sowie das Futter Iso/Nanno und das Futter Nanno/Porph, welche beide 4% gefriergetrocknetes Pulver von Mikroalgen enthielten. Im Futter Iso/Nanno wurde dabei Fischmehl und Fischöl teilweise durch *Isochrysis galbana* und *Nannochloropsis gaditana*, im Futter Nanno/Porph teilweise durch *Nannochloropsis gaditana* und *Porphyridium sordidum* ersetzt. Die Rezepturen aller im Fütterungsexperiment verwendeten Fischfutter sind in Anhang 1 aufgeführt.

In Reihe A des Fütterungsexperiments wurde das Kontrollfutter gefüttert, in Reihe B das Futter Nanno/Porph und in Reihe C kam das Futter Iso/Nanno zum Einsatz. Nachfolgend werden die Versuchsreihen nur noch nach dem verwendeten Futter benannt. Während des ganzen Experiments wurde die Wassertemperatur in den Tanks bei 25.7 ± 0.33 °C gehalten. Das Wasser sollte zusätzlich eine Sauerstoffsättigung von 100 %, einen pH-Wert zwischen 7.5 und 8 aufweisen. Die Leitfähigkeit wurde bei 738 ± 83 µS/cm gehalten. Diese Werte wurden täglich mit einer Multisonde (HQ 40d,

Hach, Schweiz) kontrolliert. Ebenfalls wurden die Futterautomaten und der Gesundheitszustand der Fische täglich kontrolliert. Einmal wöchentlich wurden die chemischen Wasserwerte (Ammonium, Nitrit und Nitrat) mit Küvetten-Tests (Hach, Schweiz) gemessen. Das Beleuchtungsregime beinhaltete einen 13 h Hell- und einen 11 h Dunkelzyklus. Die Fütterungsrate betrug zu Beginn des Experiments 12 % der Fischbiomasse pro Tag (BW/d) und wurde danach stetig dem Wachstum der Fische angepasst (siehe Tabelle 1). Die Futtermenge wurde jede Woche durch Wägen weniger Fische pro Becken bestimmt und damit auf die entsprechenden Fischbiomassen abgestimmt. Die Futtermenge pro Tag wurde anhand von 7 Portionen gefüttert. Nach 6 Wochen wurde ein Zwischensampling und nach 9 Wochen ein Schlusssampling durchgeführt. Dabei wurden alle Fische einzeln gewogen, ebenfalls wurden einige Fische mit einer Überdosis an MS-222 (Sigma-Aldrich, Schweiz) eingeschläfert, um an ihnen weiterführende Analysen (siehe Kapitel 3.2) durchzuführen (Egloff, 2017).

Tabelle 1: Fütterungsrate pro Tag in % BW während dem Fütterungsexperiment (Egloff, 2017).

Woche	Fütterungsrate pro Tag [% BW]
1	12
2	10
3	9
5	9
6	8
8	7
9	7

Nach Beendigung des Fütterungsexperiments wurden die Nährstoffdaten der Versuchsfische durch Constanze Pietsch-Schmied (ZHAW, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen, Wädenswil) erhoben und danach für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Dabei war der Fettgehalt der Fische besonders von Bedeutung und wurde anhand der Soxhlet-Methode durch Extraktion mit Petrolether ermittelt.

Die Wachstumsraten, Wachstumskurven, der HSI, sowie der SSI der Fische des Fütterungsexperiments, wurden durch Sophia Egloff (ZHAW, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen, Wädenswil) berechnet und statistisch auf Unterschiede geprüft. Diese Daten wurden anhand ihrer Master Thesis (Egloff, 2017) für weitere Vergleiche zur Verfügung gestellt. Auf die Methoden zu deren Auswertung und der statistischen Prüfung wird deshalb innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht weiter eingegangen. Zusätzlich stellte Sophia Egloff die Nährstoffanalysenberichte der Biolytix AG (Biolytix AG, Witterswil, Schweiz) zu den drei Versuchsfuttern zur Verfügung.

3.2 Histologie

Während dem Zwischensampling und dem Schlussampling des Fütterungsexperiments wurden mehrere Fische durch eine Überdosis von MS-222 (>150 mg/l) eingeschläfert und die Leber und Milz für histologische Untersuchungen entnommen. Beim Zwischensampling (nach 6 Wochen) wurde fünf Fischen pro Becken die Leber entnommen. Beim Schlussampling (nach 9 Wochen) wurde ebenfalls fünf Fischen pro Becken die Leber und zusätzlich bei zwei dieser Fische die Milz für histologische Untersuchungen entnommen. Alle entfernten Organe wurden gewogen und anschliessend für 24 Stunden in gepuffertem Formaldehyd (3.5 % in Phosphatpuffer, pH = 7.4) zur Aushärtung eingelegt. Anschliessend wurden die Organe in Ethanol (70 %) umgelagert. Pro Becken wurden jeweils die Leber und Milz zweier Fische (6 Fische pro Futtertyp) dem Institut für Fisch- und Wildtiermedizin (FIWI) der Universität Bern für die Erstellung der Histologiepräparate zugesendet (Egloff, 2017). Dort wurden 4 µm dicke Abschnitte der in Paraffin-eingebetteten Organe auf einem Objektträger fixiert und mit der H.E.-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) eingefärbt. Es wurden jeweils 3 Abschnitte einer Milz und 3 bis > 5 Abschnitte einer Leber auf jeweils einem Objektträger fixiert.

3.2.1 Fotos von Histologiepräparaten (Milz und Leber)

Mit dem Lichtmikroskop (Leica DM2000, Leica Microsystems, Deutschland) bei 100-facher Vergrösserung wurden anhand der Mikroskopkamera (Leica DFC290, Leica Microsystems, Schweiz) mit der dazugehörigen Software (Leica Application Suite Version 3.7.0, Leica Microsystems, Schweiz), von jedem Objektträger (Milz und Leber) 5 Fotos von repräsentativen, zufällig ausgewählten Ausschnitten aufgenommen. Insgesamt wurden 90 Fotos der Milz und 90 Fotos der Leber aufgenommen. Dies ergab für jede der drei Versuchsreihen (Kontrollfutter, Futter Nanno/Porph und Futter Iso/Nanno) 30 Fotos für die Milz und 30 Fotos für die Leber. Dieses Vorgehen ermöglichte eine anschliessende, digitale Auswertung (siehe Abbildung 1 & 2).

3.2.2 Bearbeitung der Fotos

Die aufgenommenen Farbfotos der Histologiepräparate der Milz wurden in GIMP (GNU Image Manipulation Program Version 2.8.16) weiterverarbeitet, so dass eine spätere Auswertung mit ImageJ möglich war. GIMP ist ein frei verfügbares Bildbearbeitungsprogramm, ausgestattet mit diversen Werkzeugen und für verschiedene Betriebssysteme verfügbar (Prokoudine et al., 2017).

Der erste Schritt der Bearbeitung war, die Farben zu invertieren (im Hauptmenü Farben, Invertieren) und dadurch den Kontrast der MAs zum umliegenden Gewebe zu erhöhen. Infolgedessen nahmen die MAs einen blauen Farbton an. Im nächsten Schritt wurden die Farbkanäle (Rot, Grün und Blau) mit dem Kanalmixer (im Hauptmenü Farben, Komponenten, Kanalmixer) anhand von Reglern so verändert, dass die MAs einen intensiveren Blauton erhielten und dadurch der Kontrast der MAs

umgebenden Gewebes nochmals verbessert werden konnte. Zuletzt wurden die einzelnen Primärfarben (Rot, Magenta, Blau, Cyan, Grün und Gelb) in ihrem Farbton, ihrer Helligkeit und in ihrer Sättigung (im Hauptmenü Farben, Farbton / Sättigung) so verändert, dass hauptsächlich noch die MAs eine Farbe aufwiesen und dass diese Farbe sich in Helligkeit und Sättigung deutlich von der Umgebung unterschied (siehe Abbildung 1).

3.2.3 Histopathologische Bewertung der Milz

Ledic-Neto et al. (2014) evaluierten im Fütterungsexperiment mit Tilapia (*Oreochromis niloticus*) die Flächen der MAs im Verhältnis zum Milzgewebe. Dementsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit zuerst die Flächen der MAs im Verhältnis zu einem immer gleich grossen Bildausschnitt quantifiziert. Dies wurde an fünf repräsentativen Ausschnitten der Milz (pro Fisch) durchgeführt. Anhand des Mittelwertes dieser fünf Stichproben wurde der prozentuale Anteil der MAs an der Gesamtfläche der Milz eruiert. Pro Becken wurde bei zwei Fischen der prozentuale Anteil der MAs an der Gesamtfläche quantifiziert (3 Becken zu jedem Futtertyp, 6 Fische pro Futtertyp), der Durchschnitt daraus wurde als repräsentativen, prozentualen Anteil der MAs (pro Becken) am Milzgewebe erachtet. Danach war ein statistischer Vergleich der drei Versuchsfütterungen möglich.

Aufgrund der Vorschläge von Papadopulos et al. (2007) wurde für die Quantifizierung der Fläche der Makrophagen-Aggregate die frei verfügbare open-source Software ImageJ (ImageJ Version 1.51p, National Institutes of Health, USA) verwendet. ImageJ wird dabei hauptsächlich für morphometrische Analysen verwendet, kann aber durchaus auch an unterschiedlichste Labor- und Forschungsanwendungen angepasst werden.

Die bearbeiteten Fotos der Histologiepräparate der Milz wurden für die Auswertung in ImageJ eingelesen. Nachdem jedes Foto einzeln eingelesen wurde, wurde im Hauptmenü (durch Analyze, Set Scale, Click to Remove Scale) der Massstab verändert, sodass alle gemessenen Werte nur noch in Anzahl Pixel angegeben wurden. Danach konnte im Hauptmenü (durch Image, Adjust, Color Threshold) ein weiteres Bedienfeld geöffnet werden. Dort konnten verschiedene Werte der Fotos (Hue, Saturation und Brightness) mit Regler verändert werden. Dadurch veränderte sich insgesamt der Schwellenwert auf den Fotos, welcher jeweils in der gewählten Farbe angezeigt wurde. Durch Veränderung dieses Schwellenwerts anhand der Regler konnte die gesamte Fläche, sowie die Fläche der Makrophagen-Aggregaten, selektiert (Bedienfeld Color Threshold, Select) und gemessen (siehe Abbildung 1) werden (Hauptmenü, Analyze, Measure). Diese Werte zeigte das Programm ImageJ in einem separaten Fenster als Flächenwerte in der Anzahl Pixel an. Durch Umrechnen dieser Werte konnte somit der prozentuale Anteil der Makrophagen-Aggregate an der gesamten Bildfläche errechnet werden. Zur Validierung der selektierten MAs wurden jeweils die Originalaufnahmen der Histologiepräparate herangezogen und auf Abweichungen überprüft. Als keine Abweichungen mehr ersichtlich waren, wurden die Flächenwerte anschliessend in eine Exceltabelle

(Excel 2016, Microsoft Corporation) übertragen. In der vorliegenden Arbeit wurde immer dieselbe Version von Excel, auch für die Datenaufbereitung, verwendet.

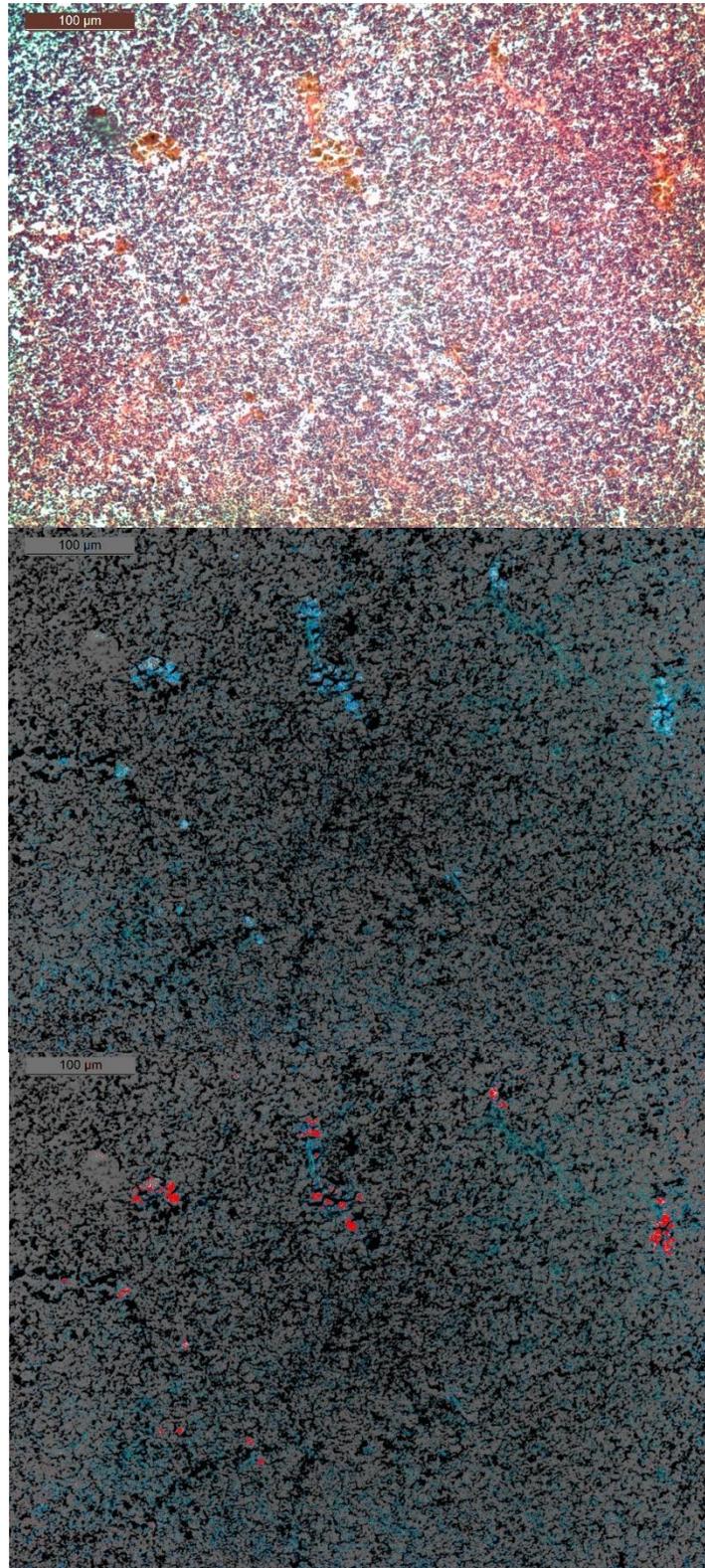


Abbildung 1: Schrittweise Selektierung der Makrophagen-Aggregate.
Bild oben: Aufnahme eines Abschnittes der Milz mit der
Mikroskopkamera. Bild Mitte: fertig bearbeitetes Bild mit GIMP. Bild
unten: abgebildet sind die selektierten MAs anhand von ImageJ.
Quelle: Andreas Seitz.

3.2.4 Histopathologische Bewertung der Leber

Grundsätzlich wurde für die histopathologische Bewertung der Leber die Methode nach Zodrow et al. (2004) verwendet. Dort wurden Histologiepräparate von Organen nach Schweregrad ihrer Veränderungen, verglichen mit Kontrollabschnitten, bewertet. Das Bewertungsschema lautete dabei - = keine histologische Veränderung, + = schwache Veränderung in < 25% der Bereiche vorhanden, ++ = mässige Veränderung in > 75% der Bereiche vorhanden und +++ = alle Bereiche wiesen starke Veränderungen auf. Um die Veränderungen besser quantifizieren zu können, wurde die Methode nach Pietsch et al. (2014) verändert. Dort wurde dieselbe semiquantitative Bewertung angewendet mit dem Unterschied, dass Zahlen für den Schweregrad der Veränderung eingesetzt wurden. Nun lautete die Bewertung also 0 = keine Veränderungen, 1 = schwache Veränderungen, 2 = mässige Veränderungen und 3 = starke Veränderungen gegenüber den Kontrollen, welches eine statistische Auswertung erleichtert. Im Fütterungsexperiment wurden selbst in der Kontrollreihe die Fische mit selbst hergestelltem Futter gefüttert (Egloff, 2017), was einen Einfluss auf die Leberhistologie haben könnte. Zur Bestimmung einer unabhängigen Kontrollgruppe (keine histologische Veränderung) wurden deshalb Bilder von histologischen Präparaten der Leber von Tilapia anderer Studien beigezogen. Durch das Vergleichen der eigenen Bilder mit Bilder der Kontrollgruppen (Erkmen et al., 2017; Guzmán-Guillén et al., 2017; Kaya et al., 2017) konnte somit der Zustand ohne histologische Veränderung identifiziert werden. Anhand der so gewonnenen Bewertungsskala (siehe Abbildung 2) wurden alle Fotos der Histologiepräparate der Leber der Versuchstiere bewertet. Dabei wurden immer fünf repräsentative Ausschnitte des Lebergewebes pro Fisch auf Veränderungen untersucht. Die Werte wurden anschliessend in eine Exceltabelle übertragen. Anhand des Mittelwertes dieser fünf Stichproben konnte der Leberzustand jedes Fisches quantifiziert werden. Pro Becken jeder Versuchsreihe mit unterschiedlichem Futter (3 Versuchsfutter insgesamt), wurden somit zwei Fische nach diesem Schema bewertet. Insgesamt wurden pro Versuchsfütterung also 6 Fische danach bewertet. Der Mittelwert von den Bewertungen der zehn Ausschnitten (fünf pro Versuchsfisch) des Lebergewebes von zwei Fischen wurde als repräsentativen Wert für den Leberzustand pro Versuchsbecken erachtet. Eine Übersicht dazu liefert die Tabelle 8 im Anhang 3, wo die verschiedenen Behandlungen mit den Versuchsfuttern und den Anzahl Stichproben aufgelistet sind. Die rot markierten Zeilen stellen dabei die repräsentativen Werte des Leberzustands pro Versuchsbecken dar. Danach wurden die Werte der drei Versuchsfütterungen, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, statistisch verglichen.

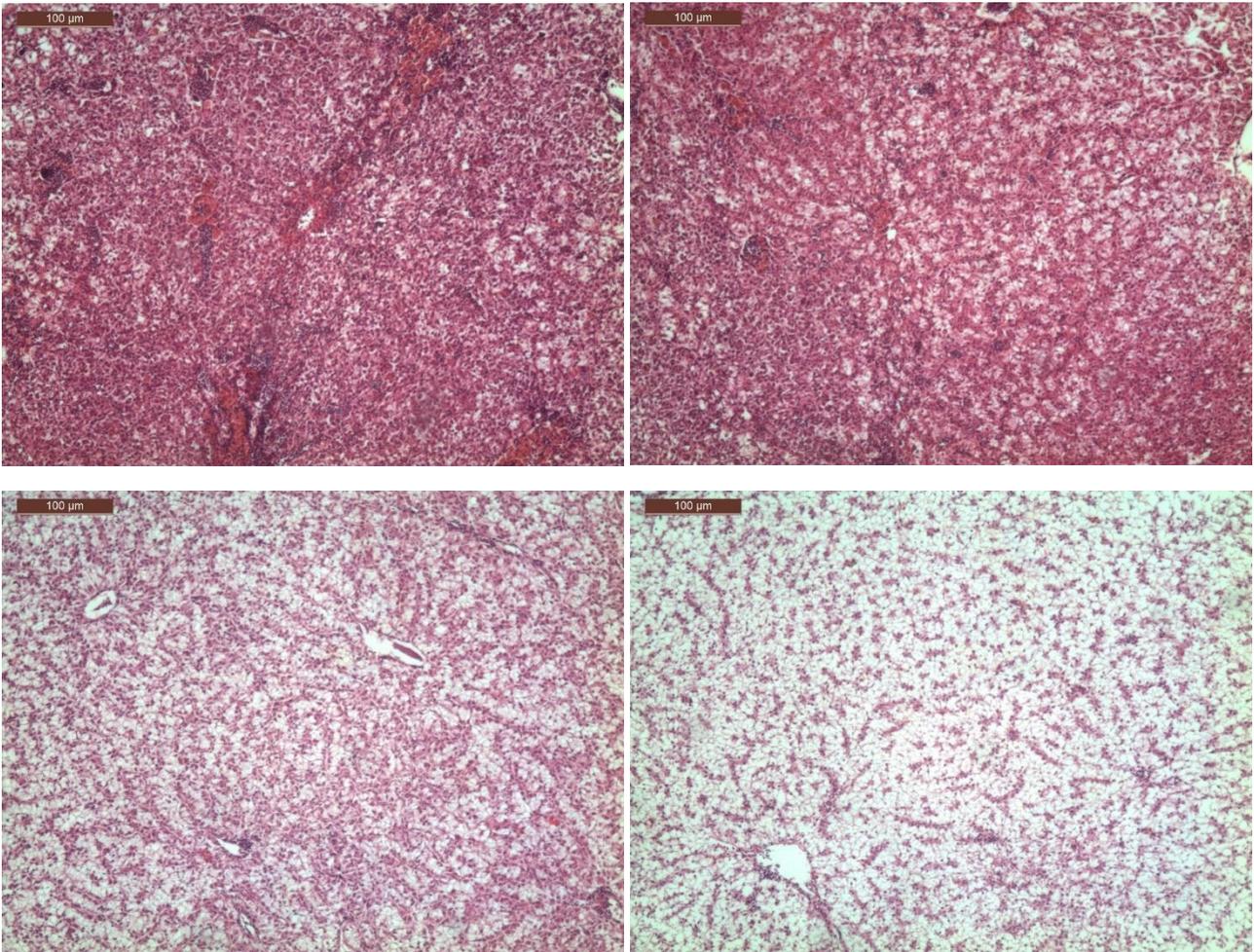


Abbildung 2: Schema für die histopathologische Bewertung der Leber, Aufnahmen von histologischen Präparaten der Lebern (des Fütterungsexperiments) mit der Mikroskopkamera bei 100-facher Vergrößerung. Bild oben links: Aufnahme aus der Versuchsreihe von Futter Iso/Nanno, zeigt den Zustand ohne histologische Veränderungen (Bewertung = 0). Bild oben rechts: Aufnahme aus der Versuchsreihe von Futter Nanno/Porph, zeigt den Zustand mit schwachen histologischen Veränderungen (Bewertung = 1). Bild unten links: Aufnahme aus der Versuchsreihe des Kontrollfutters, zeigt den Zustand mit mässigen histologischen Veränderungen (Bewertung = 2). Bild unten rechts: Aufnahme aus der Versuchsreihe von Futter Iso/Nanno, zeigt den Zustand mit starken histologischen Veränderungen (Bewertung = 3). Quelle: Andreas Seitz.

3.3 Statistische Analyse

Die Rohdaten der histopathologischen Bewertung der Milz und der Leber sowie die Rohdaten der Fettgehalte (siehe Anhang 3) wurden zuerst in Excel aufbereitet. Die bereinigten Daten wurden danach für die statistische Analyse in RStudio (Version 1.0.153, RStudio, Inc.) eingelesen und weiterverarbeitet. Zur besseren Übersicht wurden die Datenwerte mancher Stichproben in Boxplots dargestellt.

Das Signifikanzniveau wurde zuvor bei $\gamma = 95\%$ festgelegt, dabei wurden Unterschiede mit p-Wert < 0.05 als signifikant erachtet. Bei den Daten beider histopathologischen Bewertungen und den Daten der Fettgehalte wurde die Normalverteilungsannahme anhand des Shapiro-Wilk-Tests geprüft. Die Varianzhomogenität aller Datenwerte wurde mit dem Bartlett-Test überprüft. Unter Annahme der Normalverteilung und der Varianzhomogenität über alle Stichproben war es möglich, einen parametrischen Test durchzuführen. Die Mittelwerte pro Versuchsbecken der Stichproben (histopathologische Bewertung der Milz und Leber sowie Fettgehalte) aller drei Versuchsreihen des Fütterungsexperiments wurden danach mit der parametrischen, einfaktoriellen Varianz-Analyse (ANOVA) verglichen, um allfällige, signifikante Unterschiede festzustellen. Um nachzuweisen, zwischen welchen Versuchsreihen die signifikanten Unterschiede lagen, wurde zuletzt ein Post-hoc-Test (Bonferroni-Holm-Korrektur) angewendet.

In RStudio (Version 1.0.153, RStudio, Inc.) wurden ebenfalls zwischen verschiedenen Datensätzen (SSI-MAs, HSI-Leberzustand, HSI-Fettgehalt und Leberzustand-Fettgehalt) Regressionsanalysen durchgeführt. Dazu wurden die Daten abermals zuerst in Excel aufarbeitet und erst danach in RStudio eingelesen. Zuletzt wurden die Regressionen anhand des Pearson-Korrelationskoeffizienten (r) auf ihre Güte geprüft.

4 Resultate

4.1 Fütterungsexperiment

4.1.1 Fettgehalt der Versuchsfische und Versuchsfutter

Der Fettgehalt der Versuchsfische variierte zwischen den verschiedenen Versuchsfütterungen (siehe Abbildung 3). Im Mittel betrug der Fettgehalt (% der Trockensubstanz) in der Versuchsreihe des Kontrollfutters ($n = 6$) $19.59 \pm 1.6 \%$, in der vom Futter Nanno/Porph ($n = 6$) $32.32 \pm 2.2 \%$ und in der vom Futter Iso/Nanno ($n = 6$) $26.70 \pm 5.7 \%$. Nur zwischen dem Kontrollfutter und dem Futter Nanno/Porph konnten signifikante Unterschiede ($p = 0.016$) im Fettgehalt der Versuchsfische nachgewiesen werden. Der Unterschied im Fettgehalt der Fische zwischen dem Kontrollfutter und dem Futter Iso/Nanno war nicht signifikant ($p = 0.108$) ebenfalls konnten zwischen dem Futter Nanno/Porph und dem Futter Iso/Nanno keine signifikanten Unterschiede ($p = 0.108$) im Fettgehalt der Versuchsfische nachgewiesen werden. Die Rohdaten der zur Verfügung gestellten Fettgehalte sind in Anhang 3 aufgelistet.

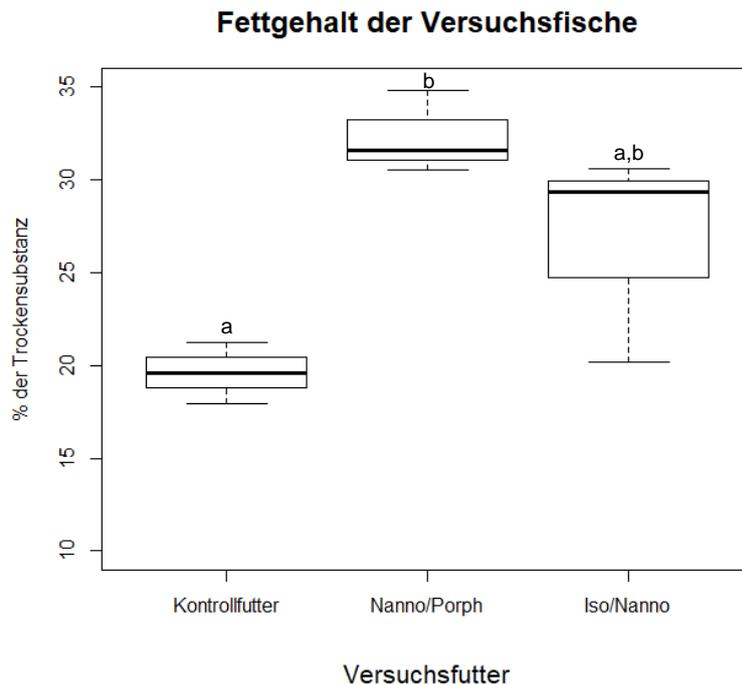


Abbildung 3: Fettgehalte der Versuchsfische des Fütterungsexperiments, angegeben in % der Trockensubstanz. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n = 3$) von drei Becken für jedes Versuchsfutter. Mittelwert des Fettgehalts der Versuchsfische des Kontrollfutters = $19.59 \pm 1.6 \%$, des Futters Nanno/Porph = $32.32 \pm 2.2 \%$ und des Futters Iso/Nanno = $26.70 \pm 5.7 \%$. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Boxplots zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten an.

Die Analysen der Biolytix AG (siehe Anhang 2) zeigten, dass der Fettgehalt aller während des Fütterungsexperiments verwendeten Versuchsfutter ähnlich hoch ist. So liegt der Fettgehalt des Kontrollfutters bei 11.2 %. Ebenso weist das Futter Nanno/Porph denselben Fettgehalt (11.2 %) auf. Der Fettgehalt vom Futter Iso/Nanno weicht nur sehr geringfügig von den Werten der anderen Versuchsfutter ab. Mit einem Fettgehalt von 11.1 % weist dieses Versuchsfutter knapp den geringsten Anteil Fett auf.

4.1.2 Berechnete Wachstumsraten und Wachstumskurven

Während des 9-wöchigen Fütterungsexperiments sind die Versuchsfische unterschiedlich schnell gewachsen und erreichten verschiedene Endgewichte (siehe Abbildung 4). Die berechneten Wachstumsraten waren für das Kontrollfutter 4.4 ± 0.1 % pro Tag, für das Futter Nanno/Porph 5.0 ± 0.1 %/d und für das Futter Iso/Nanno 5.3 ± 0.1 %/d. Diese Werte zeigen an, dass die Fische unter dem Futter Iso/Nanno am schnellsten wuchsen, gefolgt von den Fischen, welche das Futter Nanno/Porph erhielten. Am langsamsten wuchsen die Fische, denen das Kontrollfutter gefüttert wurde (Egloff, 2017).

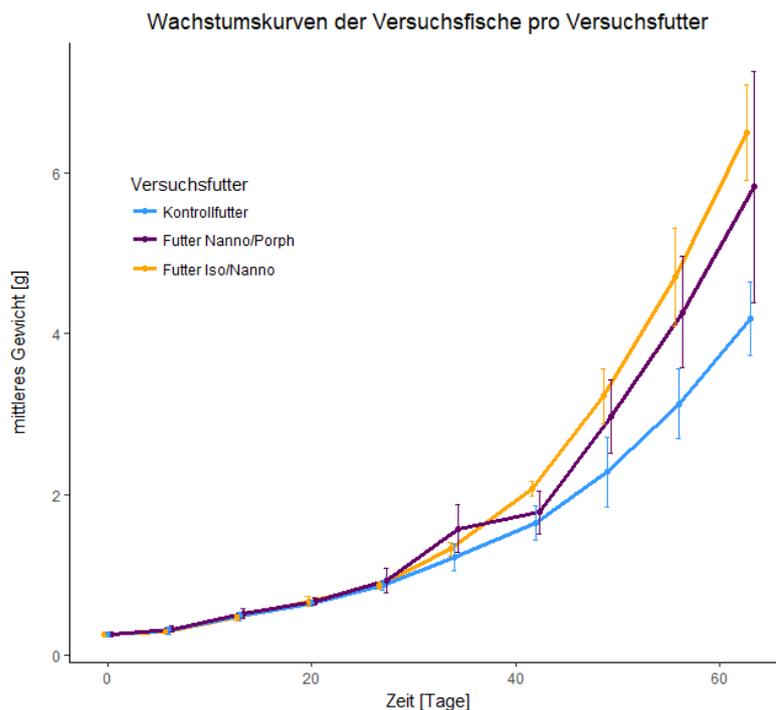


Abbildung 4: Darstellung der Wachstumskurven pro Versuchsfutter, dabei wurde das mittlere Gewicht der Versuchsfische über die Anzahl Tage (63 insgesamt) aufgezeigt. Die Fische wiesen verschiedene Wachstumsraten unter den verschiedenen Versuchsfütterungen auf. Kontrollfutter = 4.4 ± 0.1 %/d, Futter Nanno/Porph = 5.0 ± 0.1 %/d und Futter Iso/Nanno = 5.3 ± 0.1 %/d (Egloff, 2017). Die Grafik wurde abgeändert durch Andreas Seitz.

4.1.3 Organosomatische Indizes (HSI und SSI)

Die Mittelwerte der Auswertungen vom Hepatosomatischen Index (HSI), sowie vom Splenosomatischen Index (SSI), durch Sophia Egloff, sind in Tabelle 2 aufgeführt. Beim Zwischensampling wiesen die Versuchsfische, welche mit dem Kontrollfutter gefüttert wurden, den höchsten HSI (4.4 ± 1.3 %) auf. Die Fische, welche das Futter Nanno/Porph, sowie das Futter Iso/Nanno erhielten, wiesen dabei dieselben Werte auf. Auch beim Schlussampling war der HSI in der Kontrollfutterreihe mit 4.2 ± 0.6 % am höchsten, gefolgt von der Reihe, in der das Futter Iso/Nanno zum Einsatz kam. Den tiefsten Wert wies die Reihe des Futters Nanno/Porph auf. Während beiden Samplings konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede ($p > 0.05$) zwischen diesen Werten nachgewiesen werden.

Der höchste SSI (0.8 ± 0.2 %) konnte in der Reihe, in welcher das Futter Iso/Nanno gefüttert wurde, nachgewiesen werden. Den zweithöchsten Wert (0.6 ± 0.1 %) wies die Reihe vom Futter Nanno/Porph auf, der tiefste Wert (0.4 ± 0.1 %) wurde in der Kontrollfutterreihe festgestellt. Signifikante Unterschiede liessen sich zwischen der Kontrollfutterreihe und der Reihe vom Futter Iso/Nanno ($p = 0.006$) nachweisen. Weitere Vergleich zwischen den Versuchsreihen ergaben keine signifikanten Unterschiede ($p > 0.05$) (Egloff, 2017).

Tabelle 2: Auswertungen vom Hepatosomatischen Index (HSI) und vom Splenosomatischen Index (SSI) (Egloff, 2017). Beim HSI sind die Mittelwerte vom Zwischensampling und vom Schlussampling dargestellt. Beim SSI sind nur die Mittelwerte des Schlussamplings aufgeführt. Unterschiedliche Buchstaben hinter einem Wert zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsfütterungen an.

Index	Kontrollfutter	Futter Nanno/Porph	Futter Iso/Nanno	Samplingtyp
HSI [%]	4.4 ± 1.3	4.1 ± 1.3	4.1 ± 1.3	Zwischensampling
HSI [%]	4.2 ± 0.6	3.8 ± 0.9	4.0 ± 0.8	Schlussampling
SSI [%]	0.4 ± 0.1^a	$0.6 \pm 0.1^{a,b}$	0.8 ± 0.2^b	Schlussampling

Die Regressionsanalyse zwischen dem HSI (der Fische vom Schlussampling, Mittelwert pro Becken, $n = 9$) und dem Fettgehalt der Versuchsfische (Mittelwert pro Becken, $n = 9$) zeigte, dass ein eher starker negativer linearer Zusammenhang ($r = -0.680$, $F(x) = -16.57x + 92.32$) zwischen diesen Datensätzen besteht.

4.2 Histopathologische Bewertung der Milz

Im Durchschnitt über alle Stichproben pro Versuchsreihe ($n = 6$) wies die Kontrollfutterreihe den grössten prozentualen Flächenanteil der MAs (0.61 ± 0.2 %) auf. Der Flächenanteil der MAs in der Reihe, in der das Futter Nanno/Porph gefüttert wurde, lag mit 0.57 ± 0.3 % knapp darunter. Den

kleinsten Flächenanteil wies die Versuchsreihe unter dem Futter Iso/Nanno mit 0.24 ± 0.1 % auf. Die Mittelwerte pro Becken und Versuchsfütterung sind in Abbildung 5 ersichtlich.

Der prozentuale Flächenanteil der MAs am gesamten Milzgewebe lag in Becken 1 der Kontrollfutterreihe bei 0.69 ± 0.2 %, in Becken 2 bei 0.39 ± 0.2 % und in Becken 3 bei 0.76 ± 0.4 %. In Becken 1 der Reihe, in der das Futter Nanno/Porph zum Einsatz kam, lag dieser Flächenanteil bei 0.51 ± 0.1 %, in Becken 2 bei 0.30 ± 0.1 % und in Becken 3 bei 0.89 ± 0.3 %. Insgesamt lag der grösste Flächenanteil in Becken 3 der Reihe des Futters Nanno/Porph, der zweitgrösste Wert in Becken 3 der Kontrollfutterreihe. Durchwegs (ausser in Becken 1) konnten die tiefsten Flächenanteile in der Reihe des Futters Iso/Nanno nachgewiesen werden. Dort lag in Becken 1 der Flächenanteil der MAs am gesamten Milzgewebe bei 0.31 ± 0.1 %, in Becken 2 bei 0.23 ± 0.04 % und der insgesamt tiefste Flächenanteil aller Versuchsfütterungen in Becken 3 der Reihe des Futters Iso/Nanno mit einem Wert von 0.20 ± 0.03 %. Dennoch konnten mit einer einfaktoriellen Varianz-Analyse (ANOVA) keine signifikanten Unterschiede ($p = 0.143$), betreffend der prozentualen Flächenanteile der MAs zwischen den Versuchsfütterungen nachgewiesen werden. Die Rohdaten zur histopathologischen Bewertung der Milz sind in Anhang 3 aufgeführt.

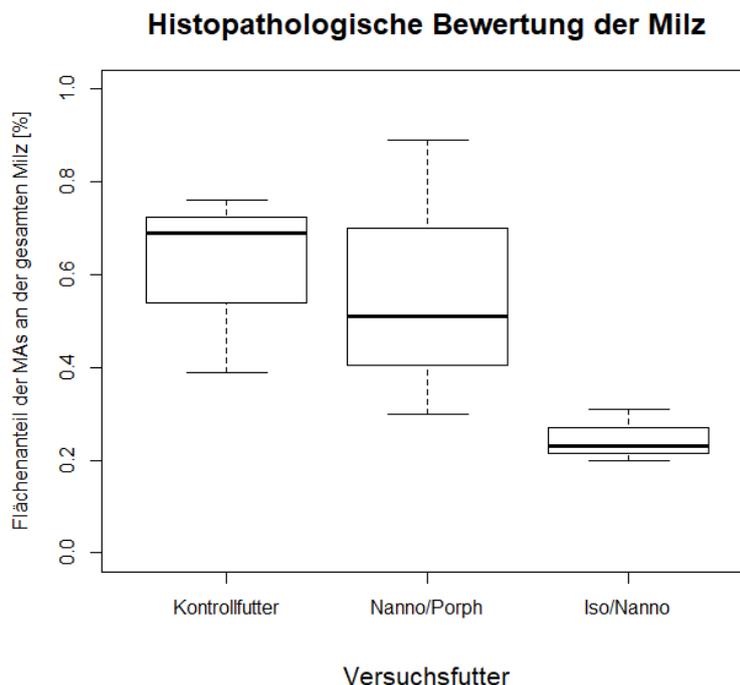


Abbildung 5: Histopathologische Bewertung der Milz, abgebildet sind die prozentualen Flächenanteile der MAs am gesamten Milzgewebe. Die Mittelwerte ($n = 3$) der Becken pro Versuchsfütterung sind in den einzelnen Boxplots dargestellt. Flächenanteil beim Kontrollfutter = 0.61 ± 0.2 %, beim Futter Nanno/Porph = 0.57 ± 0.3 % und beim Futter Iso/Nanno = 0.24 ± 0.1 %.

Die Regressionsanalyse zwischen dem SSI (aller Versuchsfische, denen die Milz entnommen wurde, $n = 18$) und dem Mittelwert der prozentualen Fläche der MAs am Milzgewebe (pro Fisch pro Becken, zwei Fische je Becken, $n = 18$) zeigte, dass ein mittelstarker negativer linearer Zusammenhang ($r = -0.464$, $F(x) = -0.506x + 0.770$) besteht (siehe Abbildung 6).

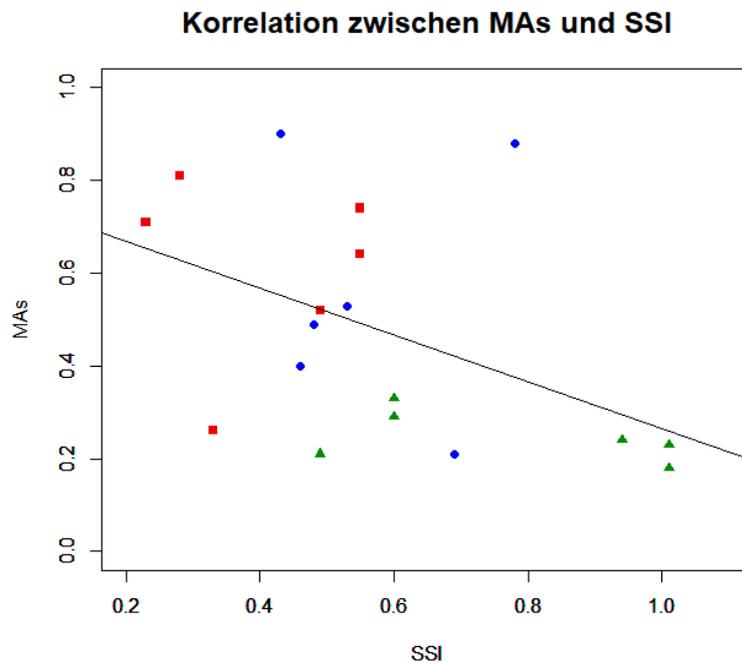


Abbildung 6: Korrelation zwischen der prozentualen Fläche der MAs am Milzgewebe und dem SSI einzelner Fische (insgesamt jeweils $n = 18$). Die Trendgerade zeigt dabei einen mittelstarken negativen linearen Zusammenhang ($r = -0.464$, $F(x) = -0.506x + 0.770$) an. Die roten Quadrate sind die Daten des Kontrollfutters, die blauen Punkte die Daten des Futters Nanno/Porph und die grünen Dreiecke die Daten vom Futter Iso/Nanno.

4.3 Histopathologische Bewertung der Leber

Die histopathologische Bewertung der Leberpräparate ergab, dass die Mehrheit der untersuchten Abschnitte der Fische, unabhängig von der Versuchsfütterung, eine Leberzellverfettung (Fetteinlagerung in den Hepatozyten), sowie zum Teil Vakuolisierungen im Gewebe aufwiesen (siehe Abbildung 7).

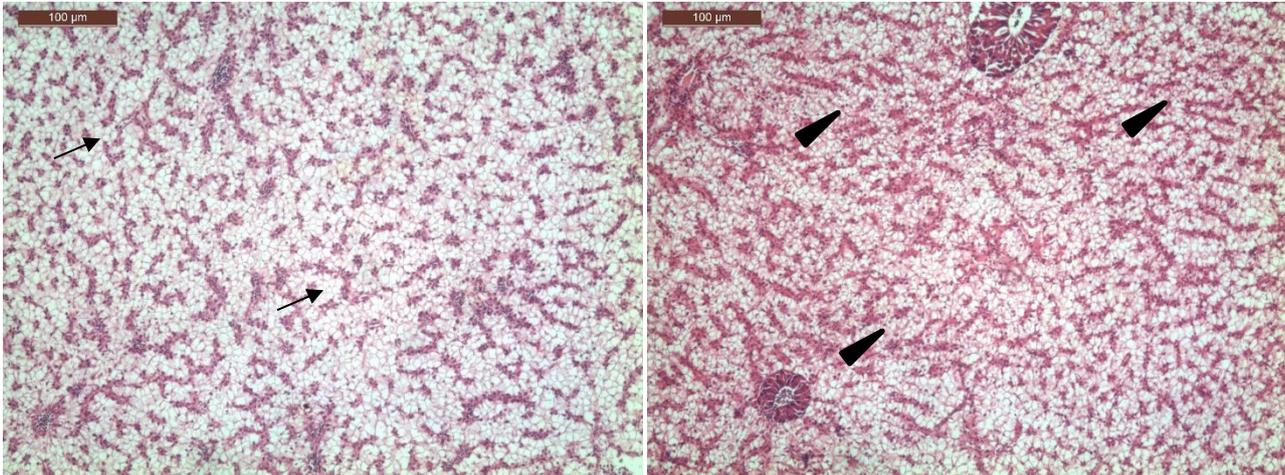


Abbildung 7: Beispiele für Leberzellverfettungen (\blacktriangleright) und Vakuolisierungen (\blacktriangleleft). Das linke Bild ist eine Aufnahme aus der Reihe des Kontrollfutters, das rechte Bild stammt aus der Reihe, in der das Futter Iso/Nanno gefüttert wurde. Quelle: Andreas Seitz.

Die semiquantitative Bewertung, bei welcher der Schweregrad von allfälligen histologischen Veränderungen bewertet wurde, fiel dementsprechend aus. So war der Mittelwert des Schweregrades der Veränderungen aller Versuchsfische ($n = 6$) pro Versuchsreihe, mit 2.63 ± 0.4 am höchsten in der Reihe des Kontrollfutters. An zweiter Stelle, mit einem Mittelwert von 2.40 ± 0.9 , lag die Reihe des Futters Iso/Nanno, dicht gefolgt von der Reihe, in der das Futter Nanno/Porph gefüttert wurde, mit einem Mittelwert von 2.37 ± 0.7 (siehe Abbildung 8).

Der repräsentative Wert für den Leberzustand (Mittelwert aus 10 Leberausschnitten pro Becken, 5 je Versuchsfisch) in der Kontrollfutterreihe belief sich in Becken 1 auf 3.0 ± 0.0 , in Becken 2 auf 2.6 ± 0.5 und in Becken 3 auf 2.3 ± 0.5 . In der Reihe, in der das Futter Nanno/Porph gefüttert wurde, konnten tiefere Werte nachgewiesen werden. Dort lag der Wert für Becken 1 bei 2.9 ± 0.3 , in Becken 2 bei 2.4 ± 0.5 und in Becken 3 bei 1.8 ± 1.0 . In der Reihe des Futters Iso/Nanno lagen ähnliche Werte vor. Dort liess sich in Becken 1 ein Wert von 2.5 ± 0.5 , in Becken 2 ein Wert von 2.9 ± 0.3 und in Becken 3 ein Wert von 1.8 ± 1.2 nachweisen. Ein statistischer Vergleich, mit einer einfaktoriellen Varianz-Analyse (ANOVA), dieser Werte zwischen allen Versuchsfütterungen ergab, dass keine signifikanten Unterschiede ($p = 0.781$) vorlagen. Die Rohdaten zur histopathologischen Leberbewertung sind im Anhang 3 aufgeführt.

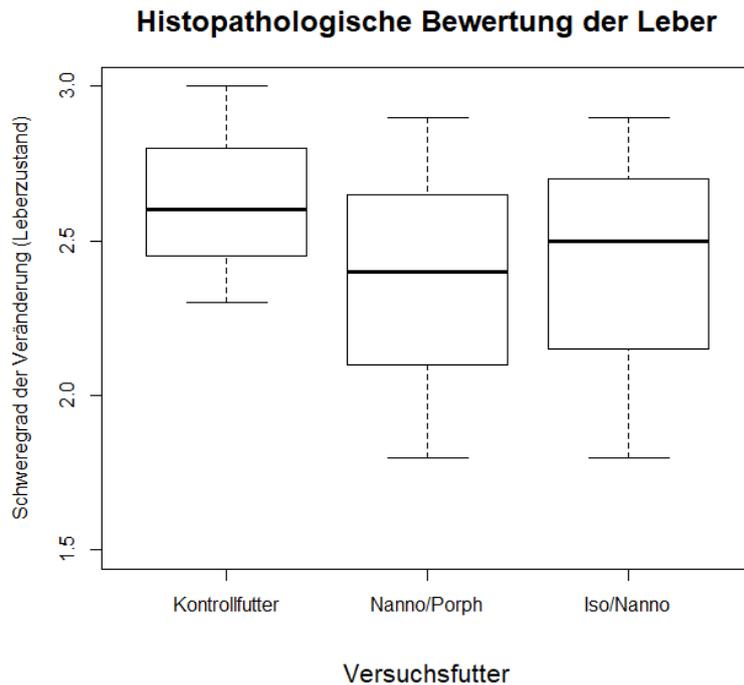


Abbildung 8: Histopathologische Bewertung der Leber, dargestellt ist der Schweregrad der Veränderung (Leberzustand) als Mittelwert der Becken ($n = 3$) für jede Versuchsfütterung. Kontrollfutter = 2.63 ± 0.4 , Futter Nanno/Porph = 2.37 ± 0.7 und Futter Iso/Nanno = 2.40 ± 0.9 .

Die Regressionsanalyse zwischen dem HSI (der Fische vom Schlusssampling, Mittelwert pro Becken, $n = 9$) und dem Leberzustand (Mittelwert pro Becken, $n = 9$) ergab, dass kein linearer Zusammenhang ($r = 0.056$, $F(x) = 0.096x + 2.084$) zwischen den Datensätzen der Versuchsfütterungen besteht. Die Regressionsanalyse zwischen dem Leberzustand ($n = 9$) und dem Fettgehalt der Fische (Mittelwert pro Versuchsbecken, $n = 9$) zeigte jedoch, dass ein mittelstarker negativer linearer Zusammenhang ($r = -0.596$, $F(x) = -8.478x + 47.117$) vorliegt.

5 Diskussion

Die histopathologische Untersuchung der Leber zeigt eindeutig, dass der Grossteil der untersuchten Lebern der Versuchsfische stark verfettet sind und teilweise Vakuolisierungen im Gewebe aufweisen. Dieses Resultat widerspiegelt sich auch klar in den relativ hohen Bewertungen des Leberzustandes, wobei in der Reihe des Kontrollfutters mit 2.63 der höchste Wert nachzuweisen ist. Auch die Reihen vom Futter Iso/Nanno und Nanno/Porph liegen mit 2.40 und 2.37 Bewertungspunkten nur knapp dahinter. Deplano et al. (1989) und Lie et al. (1988) konnten nachweisen, dass ein übermässiger Gehalt an Fett im Fischfutter als Leberfett abgelagert wurde. Dies äusserte sich schliesslich in einer Leberverfettung (Deplano et al., 1989) sowie in einer Vergrösserung der Leber (Lie et al., 1988). Auch Taddese et al. (2014) konnten bei ihrer Studie zeigen, dass Überfütterung zu einer Hypertrophie, einer Vakuolisierung, sowie einer Lipidablagerung im Lebergewebe (Hepatozyten) führen kann. Futterbedingte Lipide sind dennoch eine wichtige Quelle für verwertbare Energie und die einzige Quelle von essentiellen Fettsäuren, welche Fische für ein normales Wachstum und eine gesunde Entwicklung brauchen (Lim & Webster, 2006). Fett kann bei Energiebedarf zu Glycerol und Fettsäuren abgebaut werden, wobei das Glycerol zum Aufbau des Leberglykogens verwendet werden kann (Amlacher, 1992). Gemäss Orji (1998) ist eine Steigerung im Energiebedarf bei Fischen mit dem Verbrauch von Leberglykogen verbunden. So führte Stress, verursacht durch Fischtransport und Schadstoffe, bei *Oreochromis niloticus* zu einer Verringerung des Leberglykogens gegenüber der Kontrollgruppe (Khidr et al., 2012; Orji, 1998). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Fische, die algenhaltiges Futter erhielten, ebenfalls höhere Energieausgaben hatten als die Kontrollgruppe.

Die beim Fütterungsexperiment verwendeten Versuchsfutter weisen allesamt einen fast identischen Fettgehalt auf. Er liegt zwischen 11.2 % (Kontrollfutter, Nanno/Porph) und 11.1 % (Futter Iso/Nanno). Gemäss Jauncey (2000) sollte der Lipidgehalt im Tilapiafutter zwischen 6 und 12 % liegen, dies auch, um die Proteinverwertung zu maximieren. Auch Chou & Shiau (1996) fanden bei einem Fütterungsexperiment mit juvenilen Tilapia-Hybriden (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*) heraus, dass die Gewichtszunahme der Fische bei den Versuchsfütterungen mit 10 und 15 % Lipidgehalt am höchsten war. Anhand einer polynomen Regression konnten sie den optimalen Lipidgehalt von 12 % für ein maximales Wachstum eruieren. Ebenso erzielten Ye et al. (2016) in ihrer Studie das beste Wachstum bei *O. niloticus* anhand eines Futters mit 11 % Lipid- und 36 % Proteingehalt. Daraus lässt sich schliessen, dass der Lipidgehalt aller Versuchsfütterungen in einem optimalen Rahmen liegt. Gemäss Egloff (2017) wies die Analyse der Versuchsfutter praktisch identische Werte wie die geplanten Inhaltsstoffe auf, welche auf Tilapialarven abgestimmt waren. Untereinander waren die verschiedenen Futter bezüglich der Hauptnährstoffe sehr ähnlich, wiesen aber bei den Werten ungesättigter Fettsäuren Unterschiede auf (fehlend im Kontrollfutter), was jedoch auf einen Messfehler zurückzuführen ist. Während der optimale Gehalt an n-3 Fettsäuren im Tilapiafutter nicht bekannt ist, können Defizite an n-3 und n-6 Fettsäuren im Futter zu schlechtem

Wachstum und Fettlebern führen (Lim & Webster, 2006). Gemäss Olsen et al. (1990) sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren (n-3) essentiell für Fische, wobei die Erfordernis von n-6 Fettsäuren weniger bekannt ist. In ihrer Studie konnten sie dennoch nachweisen, dass Tilapia in der Lage ist, n-3 und n-6 Fettsäuren zu verwerten. Der Nachweis dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren in allen Versuchsfuttern, sowie überdurchschnittliche Wachstumsraten gegenüber anderen Studien (Egloff, 2017), ermöglicht die These, dass die Lipidakkumulation in den Lebern nicht auf einen Mangel, sondern eher auf einen Energieüberschuss zurückzuführen ist.

Beim Fettgehalt der Versuchsfische fällt auf, dass die Fische, welche algenhaltiges Futter (Nanno/Proph und Iso/Nanno) bekamen, einen höheren Fettgehalt im gesamten Körper aufweisen und dieser insgesamt am tiefsten bei Fischen mit der Kontrollfuttermenge ist. So sind denn auch signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollfutter und dem Futter Nanno/Proph festzustellen. Ebenfalls kann ein mittelstarker negativer linearer Zusammenhang zwischen dem bewerteten Leberzustand und dem Fettgehalt der Fische nachgewiesen werden. Dies könnte den Hinweis liefern, dass auch in diesem Fütterungsversuch die Fische das Fett mehrheitlich als Leberfett und nicht als Körperfett ablagern.

Gemäss Gingerich (1982) macht das Lebergewicht im Durchschnitt, von ausgewachsenen Echten Knochenfischen, etwa 2 % des Körpergewichtes aus. Obschon es sich bei den Versuchsfischen des Fütterungsexperiments um junge Tilapias handelte, scheinen die HSI-Werte, die durch Sophia Egloff (Egloff, 2017) erhoben wurden, erhöht zu sein. Im Fütterungsexperiment wurden Werte zwischen 3.8 und 4.4 % erreicht, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsfütterungen feststellbar war. In vergleichbaren Studien mit Niltilapia lag der HSI der Kontrollgruppen zwischen 1.9 und 2.9 (Azaza et al., 2009; Richter et al., 2003; Yue & Zhou, 2008). Dies festigt die Annahme, dass für die hier untersuchten Fische erhöhte HSI-Werte vorliegen. Eine Abnahme des HSI kann auf eine Verringerung der Energiereserven hinweisen (Barton et al., 1987), ebenfalls korreliert er mit dem Energiegehalt der Leber (Lambert & Dutil, 1997). Erhöhte Werte können auf Schadstoffe im Wasser (Slooff et al., 1983), sowie auf einen schädlichen Effekt eines Stressors hinweisen (Dethloff & Schmitt, 2000). Da bei allen Versuchsfütterungen erhöhte HSI-Werte vorliegen, können gemäss Egloff (2017) Algen im Futter als Toxin-Quelle ausgeschlossen werden, ebenfalls ist davon auszugehen, dass sich auch keine weiteren Schadstoffe in den Futtertypen befinden. Zusätzlich können die physikalischen und chemischen Wasserparameter, sowie das Frischwasser selbst, als mögliche Stressoren ausgeschlossen werden, da alle Parameter während dem Fütterungsexperiment in für Tilapia verträglichen Bereichen lagen (Egloff, 2017). Die Tatsache der erhöhten HSI verstärkt die Vermutung des Energieüberschusses, verursacht durch die Versuchsfutter, bedürfte jedoch zusätzlichen Untersuchungen. Die relativ starke negative lineare Korrelation zwischen dem HSI und dem Fettgehalt der Versuchsfische könnte ebenfalls einen Hinweis darauf liefern, dass die überschüssige Energie nicht als Körperfett, sondern als Leberfett abgelagert wird. So konnten auch Lie et al. (1988) einen positiven linearen Zusammenhang

zwischen dem HSI und der Fettzufuhr durch Futter herstellen. Entgegen dieser Feststellung kann jedoch in der vorliegenden Arbeit kein linearer Zusammenhang zwischen dem HSI und dem Leberzustand (Bewertung) erzielt werden.

Der SSI der Versuchsfische, erhoben durch Egloff (2017), liegt zwischen 0.4 (Kontrollfutter) und 0.8 (Futter Iso/Nanno). Der vom Futter Nanno/Porph liegt genau dazwischen. Verglichen mit anderen Studien an *O. niloticus*, in denen die SSI-Werte der Kontrollgruppen zwischen 0.15 und 0.23 (Abbass et al., 2012; Kareem et al., 2016; Marzouk et al., 2008) lagen, erscheinen die SSI-Werte der Versuchsfische eher erhöht. Ein erhöhter SSI scheint mit einem erkrankten Zustand verbunden zu sein, ebenso können unspezifische Stressoren sowie Schadstoffe eine Veränderung des SSI bewirken (Dethloff & Schmitt, 2000). Wie bereits beschrieben, können Schadstoffe im System und im Futter ausgeschlossen werden. Ebenso konnten während dem Sezieren der Fische für die Organentnahme, bei der äusseren Betrachtung, keine Anzeichen (Verfärbung der Organe, Schwellungen, Rötungen, Entzündungen, äussere Verfettungen, Flüssigkeit in der Leibeshöhle, weisse Knötchen, ein Geruch in der Leibeshöhle sowie hervorquellende Augen oder eingefallene Augäpfel), die auf eine Erkrankung hindeuteten (Amlacher, 1992), festgestellt werden. Gemäss Egloff (2017) sind die Ausfälle während des Fütterungsexperiments auf aggressives Verhalten in der Gruppe zurückzuführen. Aggressionen gegen ein unterlegenes Tier löst in demjenigen Stress aus (Cooper et al., 1989), was wiederum die erhöhten SSI erklären könnte. Um diese These zu verstärken, wären jedoch zusätzliche Untersuchungen (beispielsweise zu den Stresshormonmengen in den Tieren) nötig.

Entgegen der Resultate der SSI-Erhebung, zeigt die histopathologische Bewertung der Milz genau gegensätzliche Resultate. So weist die Milz der Fische, die das Kontrollfutter erhielten, den grössten prozentualen Flächenanteil der Makrophagen-Aggregate auf. Die Milz der Fische, denen das Futter Nanno/Porph gefüttert wurde, weist einen geringfügig kleineren Flächenanteil auf. Deutlich geringer ist der Anteil der MAs in der Reihe, in der das Futter Iso/Nanno zum Einsatz kam. Zwischen allen Versuchsfütterungen kann dennoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die gegenteiligen Resultate sind auch anhand des mittelstarken negativen linearen Zusammenhangs zwischen dem SSI und den MAs zu sehen. Die Literatur weist keine vergleichbaren Studien auf, mit denen die Resultate der MA-Erhebung hätten verglichen werden können. Dieser Umstand erschwert weiterführende Aussagen zum Gesundheitszustand der Versuchsfische anhand dieser Resultate.

Dennoch kann die Leber durch Verfettung degenerieren und dabei zum Tod eines Fisches führen, wobei krankhaft verfettete Lebern gelbbraun verfärbt sind, was wiederum schon ein sicheres Anzeichen dafür ist, dass die Leberzellen absterben (Amlacher, 1992). Eine Verfärbung konnte nicht beobachtet werden, ebenfalls deuten die guten Wachstumsraten der Versuchsfische (Egloff, 2017) darauf hin, dass die Lebern noch nicht krankhaft verfettet sind. Für genauere Aussagen über

nekrotisches Lebergewebe, müssten die histologischen Präparate bei grösserer Vergrößerung untersucht werden.

Ebenso gehört gemäss Bernet et al. (1999) die Histopathologie zur deskriptiven Wissenschaft, was bedeutet, dass die Erfassung von Läsionen immer von der Erfahrung und Interpretation des Untersuchenden abhängt. Aus diesem Grund wurde nicht die Methode von Bernet et al. (1999) zur Erfassung von Läsionen der Leber verwendet, sondern die Methode nach Zodrow et al. (2004) abgeändert nach Pietsch et al. (2014), da diese praktikabler erschien. Die histopathologische Methode zur Bewertung der Milz anhand der MAs, selektiert durch ImageJ, war relativ umständlich. Eventuell wäre das open-source Tool HisTOOLogy eine schnellere Alternative zu ImageJ (Magliaro et al., 2015). Um vergleichbare Resultate zu erzielen, hätte eine andere Methode gewählt werden müssen. Vielfach wurden die MAs in der Milz pro Flächeneinheit (μm^2) (Armero-Lituañas & Ocampo, 2015; Manrique et al., 2014) oder pro komplettes Organ gezählt (Suresh, 2009).

Dennoch wurden, um die Subjektivität der histopathologischen Methoden auszuschliessen, nach beendeter Erfassung (Leber und Milz) pro Versuchsreihe nochmals 3 zufällig ausgewählte Stichproben anhand der Methoden aus Kapitel 3.2.3 und 3.2.4 bewertet. Bei der Leberbewertung wurden keine Abweichungen festgestellt, bei der prozentualen Flächenerfassung der MAs traten durchschnittliche Abweichungen von $\pm 0.05\%$ auf. Diese wurden jedoch als marginal erachtet. Daher wurden die vorher erfassten Daten verwendet.

Eine weitere Herausforderung war, dass keine eigentliche Kontrollgruppe im Fütterungsexperiment vorhanden war, denn auch die Kontrollfische wurden mit selbst hergestelltem Futter (Kontrollfutter) gefüttert (Egloff, 2017) und zeigten im Vergleich zu beschriebenen Leberzustände von Tilapia in der Literatur bereits Veränderungen der Leberhistologie. Durch Vergleichen der Fotos von histologischen Präparaten der Leber (von Versuchsfischen des Fütterungsexperiments aus allen Versuchsreihen) mit denen der Kontrollgruppe aus weiteren Studien (Erkmen et al., 2017; Guzmán-Guillén et al., 2017; Kaya et al., 2017), konnte ein Zustand ohne histologische Veränderungen erhoben werden. Dort wurden ebenfalls Tilapia (*O. niloticus*) als Versuchsfische verwendet und die histologischen Präparate mit der H.E.-Färbung angefärbt, weshalb der Vergleich als zutreffend erachtet wurde.

Trotz der nicht ganz optimal gewählten Methodik bei den histopathologischen Untersuchungen scheinen die erlangten Resultate doch die Resultate von Egloff (2017) zu untermauern. Sie stellte fest, dass die Fische, welche algenhaltiges Futter (Nanno/Porph und Iso/Nanno) erhielten, signifikant besser wuchsen als die Fische unter dem Kontrollfutter. Auch die histopathologischen Bewertungen von Veränderungen zeigen tiefere Werte bei den algenhaltigen Versuchsfütterungen, was auf einen besseren Zustand der Organe schliessen lässt. Die erlangten Resultate und Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die Versuchsfische (noch) keinen krankhaften Zustand aufweisen. Um die aufgestellten Thesen zu überprüfen, wären weitere Untersuchungen nötig. So

könnte die Messung des Glykogengehalts der Leber Aufschluss über die Energiereserven liefern (Amlacher, 1992). Ebenso könnte der Lipidgehalt der Leber selbst gemessen werden. Die Messung des Leukokrit-Wertes des Blutes sowie der Glukosegehalt des Blutplasmas könnten als Indikatoren für das Stresslevel der Fische dienen (Cooper et al., 1989; McLeay & Gordon, 1977; Wedemeyer et al., 1983).

6 Schlussfolgerung

Die erlangten Resultate in der vorliegenden Arbeit unterstützen die Resultate von Egloff (2017), was den Schluss zulässt, dass die verwendeten Mikroalgen für die Fischfutterherstellung geeignet sind. Die Versuchsfische sind in guter Verfassung und scheinen noch keinen krankhaften Zustand aufzuweisen. Um die histopathologische Bewertung der Milz mit anderen Studien vergleichen zu können, müsste ergänzend noch eine andere Methode zur Bewertung gewählt werden; dennoch scheinen die bisherigen Ergebnisse plausibel. Die zu vermutende Verfettung der Leber und damit die erhöhten Werte ihrer histopathologischen Bewertung, sowie die hohen HSI der Versuchsfische sind möglicherweise auf einen Energieüberschuss im Futter zurückzuführen. Ebenso wäre es möglich, dass die hohen SSI auf ein erhöhtes Stresslevel der Fische hindeuten. Um die Thesen des Energieüberschusses sowie des erhöhten Stresslevels zu festigen, wären weitere Untersuchungen nötig.

7 Literaturverzeichnis

- Abbass, A. A., El-Asely, A. M., & Kandiel, M. M. M. (2012). Effects of dietary propolis and pollen on growth performance, fecundity and some hematological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, S. 851-859.
- Agius, C. (1979). The role of melano-macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish. *Journal of Fish Diseases*, 2(4), S. 337-343.
- Agius, C., & Agbede, S. A. (1984). An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *Journal of Fish Biology*, 24(4), S. 471-488.
- Agius, C., & Roberts, R. J. (1981). Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. *Journal of Fish Biology*, 19(2), S. 161-169.
- Amlacher, E. (1992). *Taschenbuch der Fischkrankheiten: Grundlagen der Fischpathologie* (6. Ausg.). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Armero-Lituañas, M. A., & Ocampo, P. P. (2015). Melanomacrophage proliferation in the spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) as biomarker of insecticides loading from the waters of Laguna de Bay, Municipality of Bay, Laguna, Philippines. *International Journal of Agricultural Resources, Governance and Ecology*, 11(1), S. 11-23.
- Aschoff L. (1924). Das reticulo-endotheliale System. In F. Kraus, E. Meyer, O. Minkowski, F. Müller, H. Sahli, A. Schittenhelm, A. Czerny, O. Heubner & L. Langstein (Hrsg.), *Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde*. (26. Ausg. S. 1-118) Springer-Verlag.
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104, S. 199-235.
- Azaza, M. S., Wassim, K., Mensi, F., Abdelmouleh, A., Brini, B., & Kraïem, M. M. (2009). Evaluation of faba beans (*Vicia faba* L. var. *minuta*) as a replacement for soybean meal in practical diets of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 287, S. 174-179.
- Barton, B. A., Schreck, C. B., & Barton, L. D. (1987). Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2, S. 173-185.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22, S. 25-34.
- Blazer, V. S., Wolke, R. E., Brown, J., & Powell, C. A. (1987). Piscine macrophage aggregate parameters as health monitors: effect of age, sex, relative weight, season and site quality in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquatic Toxicology*, 10(4), S. 199-215.
- Brown, C. L., & George, C. J. (1985). Age-dependent accumulation of macrophage aggregates in the yellow perch, *Perca flavescens* (Mitchill). *Journal of Fish Diseases*, 8(1), S. 135-138.

- Bruslé J., & Anadon G. G. (1996). The Structure and Function of Fish Liver. In J. S. Datta Munshi, & H. M. Dutta (Hrsg.), *Fish Morphology. Horizon of New Research*. (S. 77-93)
- Catton, W. T. (1951). Blood Cell Formation in Certain Teleost Fishes. *Blood*, 6, S. 39-60.
- Chou, B. S., & Shiau, S. Y. (1996). Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 143(2), S. 185-195.
- Conte, F. S. (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86, S. 205-223.
- Cooper, E. L., Peters, G., Ahmed, I. I., Faisal, M., & Ghoneum, M. (1989). Aggression in *Tilapia* affects immunocompetent leucocytes. *Aggressive Behavior*, 15(1), S. 13-22.
- Deplano, M., Connes, R., Diaz, J. P., & Paris, J. (1989). Intestinal steatosis in the farm-reared sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 6, S. 121-130.
- Dethloff G. M., & Schmitt C. J. (2000). Condition factor and organosomatic indices. In C. J. Schmitt, & G. M. Dethloff (Hrsg.), *Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: selected methods for monitoring chemical contaminants and their effects in aquatic ecosystems. Information and Technology Report USGS/BRD/ITR-2000-0005*. (S. 13-18)
- Egloff, S. (2017). *Algenhaltiges Fischfutter – Kultivierung von Mikroalgen und Fütterungsversuche mit juvenilen Tilapia (Oreochromis niloticus)*. (Master Thesis). ZHAW Life Sciences und Facility Management, Wädenswil.
- Erkmen, B., Karasu Benli, A. Ç, Ağuş, H. H., Yıldırım, Z., Mert, R., & Erkoç, F. (2017). Impact of sublethal di-n-butyl phthalate on the aquaculture fish species Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): histopathology and oxidative stress assessment. *Aquaculture Research*, 48(2), S. 675-685.
- Fänge, R., & Nilsson, S. (1985). The fish spleen: structure and function. *Experientia*, 41(2), S. 152-158.
- FAO. (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rom: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fournie, J. W., Summers, K. J., Courtney, L. A., Engle, V. D., & Blazer, V. S. (2001). Utility of Splenic Macrophage Aggregates as an Indicator of Fish Exposure to Degraded Environments. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13(2), S. 105-116.
- Gingerich W. H. (1982). Hepatic toxicology of fishes. In L. J. Weber (Hrsg.), *Aquatic toxicology*. (S. 55-105). New York: Raven Press.
- Guzmán-Guillén, R., Prieto Ortega, Ana I., Moyano, R., Blanco, A., Vasconcelos, V., & Cameán, A. M. (2017). Dietary L-carnitine prevents histopathological changes in tilapia (*Oreochromis Niloticus*) exposed to cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*, 32(1), S. 241-254.

- Handy, R. D., Runnalls, T., & Russell, P. M. (2002). Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in southern England that meet the Freshwater Fisheries Directive. *Ecotoxicology*, 11(6), S. 467-479.
- Henry, E. C. (2012). The use of algae in fish feeds as alternatives to fishmeal. *International Aquafeed*, S. 10-13.
- Hinck, J. E., Schmitt, C. J., Blazer, V. S., Denslow, N. D., Bartish, T. M., Anderson, P. J., Coyle, J. J., Dethloff, G. M., & Tillitt, D. E. (2006). Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Columbia River and its tributaries: Spatial and temporal trends. *Science of the Total Environment*, 366, S. 549-578.
- Homechaudhuri, S., & Jha, A. (2001). A Technique to Evaluate the Erythropoietic Efficiency in Fish. *Asian Fisheries Science*, 14, S. 453-455.
- Jackson, A. (2012). Fishmeal & fish oil and its role in sustainable aquaculture. *International Aquafeed*, S. 18-21.
- Jauncey K. (2000). Nutritional requirements. In M. C. M. Beveridge, & B. J. McAndrew (Hrsg.), *Tilapias: Biology and Exploitation*. (S. 327-375) Kluwer Academic Publishers.
- Johnson, L. L., Stehr, C. M., Olson, O. P., Myers, M. S., Pierce, S. M., Wigren, C. A., McCain, B. B., & Varanasi, U. (1993). Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. *Environmental Science & Technology*, 27(13), S. 2759-2771.
- Kareem, Z. H., Abdelhadi, Y. M., Christianus, A., Karim, M., & Romano, N. (2016). Effects of some dietary crude plant extracts on the growth and gonadal maturity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and their resistance to *Streptococcus agalactiae* infection. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, S. 757-769.
- Kaya, H., Duysak, M., Akbulut, M., Yılmaz, S., Gürkan, M., Arslan, Z., Demir, V., & Ateş, M. (2017). Effects of subchronic exposure to zinc nanoparticles on tissue accumulation, serum biochemistry, and histopathological changes in tilapia (*Oreochromis Niloticus*). *Environmental Toxicology*, 32(4), S. 1213-1225.
- Khidr, B. M., Mekkawy, I. A. A., Harabawy, A. S. A., & Ohaida, A. S. M. I. (2012). Effect of lead nitrate on the liver of the cichlid fish (*Oreochromis niloticus*): a light microscope study. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(18), S. 854-862.
- Lambert, Y., & Dutil, J. (1997). Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, S. 104-112.
- Lamers, C. H. J., & De Haas, M. J. H. (1985). Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). *Cell and Tissue Research*, 242(3), S. 491-498.

- Ledic-Neto, J., Dotta, G., Garcia, P., Brum, A., Gonçalves, E. L. T., & Martins, M. L. (2014). Haematology and melanomacrophage centers of Nile tilapia fed supplemented diet with propolis. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 36(3), S. 263-269.
- Lie, Ø, Lied, E., & Lambertsen, G. (1988). Feed optimization in atlantic cod (*Gadus morhua*): Fat versus protein content in the feed. *Aquaculture*, 69, S. 333-341.
- Lim C. E., & Webster C. D. (2006). Nutrient Requirements. In C. E. Lim, & C. D. Webster (Hrsg.), *Tilapia: Biology, Culture, and Nutrition*. (S. 469-501) The Haworth Press.
- Magliaro, C., Tirella, A., Mattei, G., Pirone, A., & Ahluwalia, A. (2015). HisTOOLogy: an open-source tool for quantitative analysis of histological sections. *Journal of Microscopy*, 260(3), S. 260-267.
- Manrique, W. G., da Silva Claudiano, G., Petrillo, T. R., de Castro, M. P., Pereira Figueiredo, M. A., de Andrade Belo, M. A., de Moraes, J. R. E., & de Moraes, F. R. (2014). Response of splenic melanomacrophage centers of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) to inflammatory stimuli by BCG and foreign bodies. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(5), S. 1001-1006.
- Marzouk, M. S., Moustafa, M. M., & Mohamed, N. M. (2008). Evaluation of immunomodulatory effects of some probiotics on cultured *Oreochromis niloticus*. *8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, S. 1043-1058.
- McLeay, D. J., & Gordon, M. R. (1977). Leucocrit: A Simple Hematological Technique for Measuring Acute Stress in Salmonid Fish, Including Stressful Concentrations of Pulpmill Effluent. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 34(11), S. 2164-2175.
- Meinelt, T., Krüger, R., Pietrock, M., Osten, R., & Steinberg, C. (1997). Mercury pollution and macrophage centres in pike (*Esox lucius*) tissues. *Environmental Science and Pollution Research*, 4(1), S. 32-36.
- Obach, A. (2012). Options and challenges of alternative protein and energy resources for aquafeed. *International Aquafeed*, S. 22-25.
- Olsen, R. E., Henderson, R. J., & McAndrew, B. J. (1990). The conversion of linoleic acid and linolenic acid to longer chain polyunsaturated fatty acids by *Tilapia (Oreochromis) nilotica* in vivo. *Fish Physiology and Biochemistry*, 8(3), S. 261-270.
- Orji, R. C. A. (1998). Effect of transportation stress on hepatic glycogen of *Oreochromis niloticus* (L.). *Naga, The ICLARM Quarterly*, 21(3), S. 20-22.
- Papadopulos, F., Spinelli, M., Valente, S., Foroni, L., Orrico, C., Alviano, F., & Pasquinelli, G. (2007). Common Tasks in Microscopic and Ultrastructural Image Analysis Using ImageJ. *Ultrastructural Pathology*, 31(6), S. 401-407.
- Paperna, I. (1991). Diseases caused by parasites in the aquaculture of warm water fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, S. 155-194.

- Pietsch, C., Schulz, C., Rovira, P., Kloas, W., & Burkhardt-Holm, P. (2014). Organ Damage and Hepatic Lipid Accumulation in Carp (*Cyprinus carpio* L.) after Feed-Borne Exposure to the Mycotoxin, Deoxynivalenol (DON). *Toxins*, 6, S. 756-778.
- Press, C. M., & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(4), S. 309-318.
- Prokoudine, A., Schumacher, M. & David, P. (2017). *GIMP - GNU Image Manipulation Program*. Abgerufen am 07. Juli 2017 von <https://www.gimp.org/>.
- Richter, N., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Evaluation of nutritional quality of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*, 217, S. 599-611.
- Russell, P. M., Davies, S. J., Gouveia, A., & Tekinay, A. A. (2001). Influence of dietary starch source on liver morphology in juvenile cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture Research*, 32, S. 306-314.
- Segner, H., & Braunbeck, T. (1988). Hepatocellular adaptation to extreme nutritional conditions in ide, *Leuciscus idus melanotus* L. (Cyprinidae). A morphofunctional analysis. *Fish Physiology and Biochemistry*, 5(2), S. 79-97.
- Seitz, A. (2017). *Verwendung von Mikroalgen für die Fischfutterherstellung – Nährstoffzusammensetzung und Analyse von drei verschiedenen Mikroalgen (Nannochloropsis gaditana, Isochrysis galbana, Porphyridium sordidum)*. (Semesterarbeit 2). ZHAW Life Sciences und Facility Management, Wädenswil.
- Serrano, J. A., Nematipour, G. R., & Gatlin, D. M. I. (1992). Dietary protein requirement of the red drum (*Sciaenops ocellatus*) and relative use of dietary carbohydrate and lipid. *Aquaculture*, 101, S. 283-291.
- Slooff, W., Van Kreijl, C. F., & Baars, A. J. (1983). Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology*, 4(1), S. 1-14.
- Spazier, E., Storch, V., & Braunbeck, T. (1992). Cytopathology of spleen in eel *Anguilla anguilla* exposed to a chemical spill in the Rhine River. *Diseases of Aquatic Organisms*, 14, S. 1-22.
- Suresh, N. (2009). Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in *Tilapia mossambica*. *Journal of Environmental Biology*, 30(4), S. 505-508.
- Taddese, F., Huh, M. D., Bai, S. C., & Vijverberg, J. (2014). Histological Changes of Liver in Overfed Young Nile Tilapia. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 9(2), S. 63-74.
- Tanaka, R., Higo, Y., Murata, H., & Nakamura, T. (1999). Accumulation of Hydroxy Lipids in Live Fish with Oxidative Stress. *Fisheries Science*, 65(5), S. 796-797.
- Trichet, V. V. (2010). Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research*, 41(3), S. 356-372.

- Vijayan, M. M., & Leatherland, J. F. (1988). Effect of stocking density on the growth and stress-response in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture*, 75, S. 159-170.
- Vogelbein, W. K., Fournie, J. W., & Overstreet, R. M. (1987). Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melano-macrophage centres in *Rivulus marmoratus*. *Journal of Fish Biology*, 31, S. 145-153.
- Wedemeyer, G. A., Gould, R. W., & Yasutake, W. T. (1983). Some potentials and limits of the leucocrit test as a fish health assessment method. *Journal of Fish Biology*, 23(6), S. 711-716.
- Wolke R. E., George C. J., & Blazer V. S. (1985). Pigmented Macrophage Accumulations (MMC; PMB): Possible Monitors of Fish Health. In W. J. Hargis (Hrsg.), *NOAA Technical Report NMFS 25. Parasitology and Pathology of Marine Organisms of the World Ocean*. (S. 93-97).
- Wolke, R. E. (1992). Piscine macrophage aggregates: A review. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, S. 91-108.
- Xu, W. N., Liu, W. B., Shao, X. P., Jiang, G. Z., & Li, X. F. (2012). Effect of Trichlorfon on Hepatic Lipid Accumulation in Crucian Carp *Carassius auratus gibelio*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 24(3), S. 185-194.
- Ye, J., Chen, J., & Wang, K. (2016). Growth performance and body composition in response to dietary protein and lipid levels in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) subjected to normal and temporally restricted feeding regimes. *Journal of Applied Ichthyology*, 32(2), S. 332-338.
- Yue, Y., & Zhou, Q. (2008). Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, feed utilization, and hematological indexes for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture*, 284, S. 185-189.
- Zodrow, J. M., Stegeman, J. J., & Tanguay, R. L. (2004). Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 66, S. 25-38.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schrittweise Selektierung der Makrophagen-Aggregate. Bild oben: Aufnahme eines Abschnittes der Milz mit der Mikroskopkamera. Bild Mitte: fertig bearbeitetes Bild mit GIMP. Bild unten: abgebildet sind die selektierten MAs anhand von ImageJ. Quelle: Andreas Seitz. 15

Abbildung 2: Schema für die histopathologische Bewertung der Leber, Aufnahmen von histologischen Präparaten der Lebern (des Fütterungsexperiments) mit der Mikroskopkamera bei 100-facher Vergrößerung. Bild oben links: Aufnahme aus der Versuchsreihe von Futter Iso/Nanno, zeigt den Zustand ohne histologische Veränderungen (Bewertung = 0). Bild oben rechts: Aufnahme aus der Versuchsreihe von Futter Nanno/Porph, zeigt den Zustand mit schwachen histologischen Veränderungen (Bewertung = 1). Bild unten links: Aufnahme aus der Versuchsreihe des Kontrollfutters, zeigt den Zustand mit mässigen histologischen Veränderungen (Bewertung = 2). Bild unten rechts: Aufnahme aus der Versuchsreihe von Futter Iso/Nanno, zeigt den Zustand mit starken histologischen Veränderungen (Bewertung = 3). Quelle: Andreas Seitz..... 17

Abbildung 3: Fettgehalte der Versuchsfische des Fütterungsexperiments, angegeben in % der Trockensubstanz. Dargestellt sind die Mittelwerte (n = 3) von drei Becken für jedes Versuchsfutter. Mittelwert des Fettgehalts der Versuchsfische des Kontrollfutters = 19.59 ± 1.6 %, des Futters Nanno/Porph = 32.32 ± 2.2 % und des Futters Iso/Nanno = 26.70 ± 5.7 %. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Boxplots zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten an. 19

Abbildung 4: Darstellung der Wachstumskurven pro Versuchsfutter, dabei wurde das mittlere Gewicht der Versuchsfische über die Anzahl Tage (63 insgesamt) aufgezeigt. Die Fische wiesen verschiedene Wachstumsraten unter den verschiedenen Versuchsfütterungen auf. Kontrollfutter = 4.4 ± 0.1 %/d, Futter Nanno/Porph = 5.0 ± 0.1 %/d und Futter Iso/Nanno = 5.3 ± 0.1 %/d (Egloff, 2017). Die Grafik wurde abgeändert durch Andreas Seitz..... 20

Abbildung 5: Histopathologische Bewertung der Milz, abgebildet sind die prozentualen Flächenanteile der MAs am gesamten Milzgewebe. Die Mittelwerte (n = 3) der Becken pro Versuchsfütterung sind in den einzelnen Boxplots dargestellt. Flächenanteil beim Kontrollfutter = 0.61 ± 0.2 %, beim Futter Nanno/Porph = 0.57 ± 0.3 % und beim Futter Iso/Nanno = 0.24 ± 0.1 %. 22

Abbildung 6: Korrelation zwischen der prozentualen Fläche der MAs am Milzgewebe und dem SSI einzelner Fische (insgesamt jeweils n = 18). Die Trendgerade zeigt dabei einen mittelstarken negativen linearen Zusammenhang ($r = -0.464$, $F(x) = -0.506x + 0.770$) an. Die roten Quadrate sind die Daten des Kontrollfutters, die blauen Punkte die Daten des Futters Nanno/Porph und die grünen Dreiecke die Daten vom Futter Iso/Nanno..... 23

Abbildung 7: Beispiele für Leberzellverfettungen (→) und Vakuolisierungen (▼). Das linke Bild ist eine Aufnahme aus der Reihe des Kontrollfutters, das rechte Bild stammt aus der Reihe, in der das Futter Iso/Nanno gefüttert wurde. Quelle: Andreas Seitz..... 24

Abbildung 8: Histopathologische Bewertung der Leber, dargestellt ist der Schweregrad der Veränderung (Leberzustand) als Mittelwert der Becken (n = 3) für jede Versuchsfütterung. Kontrollfutter = 2.63 ± 0.4 , Futter Nanno/Porph = 2.37 ± 0.7 und Futter Iso/Nanno = 2.40 ± 0.9 25

Abbildung 9: Seite 1 des Analysenberichts vom Kontrollfutter (gefüttert in Reihe A). Die Resultate der Analyse sind grau markiert. Die weiteren Seiten (2 und 3) zeigen die einzelnen Fettsäurespektren, werden hier aber nicht aufgeführt. Der Bericht wurden von Sophia Egloff zur Verfügung gestellt. Quelle: Biolytix AG, Witterswil, Schweiz. 44

Abbildung 10: Seite 1 des Analysenberichts vom Futter Nanno/Porph, das in Reihe B gefüttert wurde. Die Resultate der Analyse sind grau markiert. Die weiteren Seiten (2 und 3) zeigen die einzelnen Fettsäurespektren, werden hier aber nicht aufgeführt. Der Bericht wurde von Sophia Egloff zur Verfügung gestellt. Quelle: Biolytix AG, Witterswil, Schweiz..... 45

Abbildung 11: Seite 1 des Analysenberichts vom Futter Iso/Nanno, das in Reihe C gefüttert wurde. Die Resultate der Analyse sind grau markiert. Die weiteren Seiten (2 und 3) zeigen die einzelnen Fettsäurespektren, werden hier aber nicht aufgeführt. Der Bericht wurde von Sophia Egloff zur Verfügung gestellt. Quelle: Biolytix AG, Witterswil, Schweiz. 46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fütterungsrate pro Tag in % BW während dem Fütterungsexperiment (Egloff, 2017)...	12
Tabelle 2: Auswertungen vom Hepatosomatischen Index (HSI) und vom Splenosomatischen Index (SSI) (Egloff, 2017). Beim HSI sind die Mittelwerte vom Zwischensampling und vom Schlusssampling dargestellt. Beim SSI sind nur die Mittelwerte des Schlusssamplings aufgeführt. Unterschiedliche Buchstaben hinter einem Wert zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsfütterungen an.	21
Tabelle 3: Zusammensetzung des Kontrollfutters, welches in Reihe A des Fütterungsexperiments gefüttert wurde. Rezeptur und Herstellung gemäss Seitz (2017).....	42
Tabelle 4: Zusammensetzung des Futters Nanno/Porph, welches in Reihe B des Fütterungsexperiments gefüttert wurde. Rezeptur und Herstellung gemäss Seitz (2017).....	42
Tabelle 5: Zusammensetzung des Futters Iso/Nanno, welches in Reihe C des Fütterungsexperiments gefüttert wurde. Rezeptur und Herstellung gemäss Seitz (2017).....	43
Tabelle 6: Rohdaten zum Fettgehalt [% TS] der Versuchsfische, zur Verfügung gestellt durch Constanze Pietsch-Schmied.	47
Tabelle 7: Rohdaten zur histopathologischen Bewertung der Milz pro Versuchsfutter. Angegeben sind die prozentualen Flächenanteile der MAs aller Stichproben. Blau markiert sind die Mittelwerte pro Fisch und grün markiert sind die Mittelwerte eines Beckens.	48
Tabelle 8: Rohdaten zur histopathologischen Bewertung der Leber pro Versuchsfutter. Dargestellt sind die Werte der Stichproben zum Leberzustand, blau markiert sind die Mittelwerte pro Fisch und rot markiert sind die Mittelwerte eines Beckens.	49

Anhang

Anhang 1: Rezepturen der im Fütterungsexperiment verwendeten Fischfutter

Anhang 2: Analysewerte der im Fütterungsexperiment verwendeten Fischfutter

Anhang 3: Rohdaten

Anhang 4: Plagiatserklärung

Anhang 1: Rezepturen der im Fütterungsexperiment verwendeten Fischfutter

Tabelle 3: Zusammensetzung des Kontrollfutters, welches in Reihe A des Fütterungsexperiments gefüttert wurde. Rezeptur und Herstellung gemäss Seitz (2017).

Kontrollfutter		
Zusammensetzung	für 100 kg [kg]	für 6500 g [g]
Casein	19.875	1291.9
Fischmehl	25.0	1625.0
Weizenmehl	14.875	966.9
Fischöl	7.725	502.1
Maisstärke	24.875	1616.9
Vitaminmix	0.4	26.0
Blutmehl	2.375	154.4
Reismehl (polished)	3.875	251.9
Titaniumoxid	1.0	65.0

Tabelle 4: Zusammensetzung des Futters Nanno/Porph, welches in Reihe B des Fütterungsexperiments gefüttert wurde. Rezeptur und Herstellung gemäss Seitz (2017).

Futter Nanno/Porph		
Zusammensetzung	für 100 kg [kg]	für 6500 g [g]
Casein	19.2	1248.0
Fischmehl	23.8	1547.0
Weizenmehl	13.025	846.6
Fischöl	7.45	484.3
Maisstärke	24.875	1616.9
Vitaminmix	0.4	26.0
Blutmehl	2.375	154.4
Reismehl (polished)	3.875	251.9
Titaniumoxid	1.0	65.0
<i>Porphyridium sordidum</i> (Pulver gefriergetrocknet)	2.0	130.0
<i>Nannochloropsis gaditana</i> (Pulver gefriergetrocknet)	2.0	130.0

Tabelle 5: Zusammensetzung des Futters Iso/Nanno, welches in Reihe C des Fütterungsexperiments gefüttert wurde. Rezeptur und Herstellung gemäss Seitz (2017).

Futter Iso/Nanno		
Zusammensetzung	für 100 kg [kg]	für 6500 g [g]
Casein	19.6	1274.0
Fischmehl	24.0	1560.0
Weizenmehl	12.525	814.1
Fischöl	7.35	477.8
Maisstärke	24.875	1616.9
Vitaminmix	0.4	26.0
Blutmehl	2.375	154.4
Reismehl (polished)	3.875	251.9
Titaniumoxid	1.0	65.0
<i>Isochrysis galbana</i> (Pulver gefriergetrocknet)	2.0	130.0
<i>Nannochloropsis gaditana</i> (Pulver gefriergetrocknet)	2.0	130.0

Anhang 2: Analysewerte der im Fütterungsexperiment verwendeten Fischfutter

Biolytix AG
Molecular
Biological Analysis

Benkenstrasse 254
CH-4108 Witterswil
Switzerland

Telefon +41 61 725 20 70
Telefax +41 61 725 20 71

www.biolytix.ch
mailbox@biolytix.ch



ZHAW
Frau Sophia Egloff
Grüntal
8820 Wädenswil

Analysenbericht



SWISS
TESTING
LABS

ISO/IEC 17025
Association of Swiss Laboratories
Verband Schweizer Laboratorien
Association des Laboratoires Suisses
Associazione dei Laboratori Svizzeri

Auftragsdatum: 10. April 2017 Witterswil, 09. Mai 2017
Probeneingang: 12. April 2017

bx Nr.: bx38381-201799
Probenbezeichnung: Futter A Kontrolle
Proben ID: 1

Resultate

Wassergehalt (§64LFGB L17.00-1,mod)	4.7	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Asche (§ 64 LFGB L 17.00-3, mod)	5.3	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fett	11.2	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fettsäure, gesättigt	<0.1	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fettsäure, ungesättigt	0.3	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fettsäure, mehrfach ungesättigt	<0.1	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Gesamtprotein Nx6.25	38.3	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Kohlenhydrate (berechnet)	37.7	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Energiewert, kJ (berechnet)	1730	[kJ/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Energiewert, kcal (berechnet)	411	[kcal/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Zucker, gesamt	0.71	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fructose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Glucose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Saccharose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Maltose	0.71	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Lactose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Natrium (DIN EN ISO 11885-E22)	0.39	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
NaCl (berechnet aus Natrium)	0.97	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Rohfaser (VDLUF A 6.1.1)	2.8	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor

Chemische/Physikalische Analytik	Messwert	Einheit
Fettsäurespektrum		
Fettsäuren, trans-	<0.1	g/100 g

Hinweis: *diese Methode ist nicht im akkreditierten Bereich
Angaben zu den angewandten Methoden und Messunsicherheiten können bei der biolytix AG erfragt werden.
Ohne schriftliche Genehmigung der biolytix AG darf dieser Bericht nicht auszugsweise kopiert werden.

Disclaimer: Das Resultat bezieht sich nur auf das untersuchte Muster. Biolytix AG führt sämtliche Arbeiten mit der grösstmöglichen Sorgfalt und unter Berücksichtigung der neusten wissenschaftlichen Forschung und Methode aus. Trotzdem kann biolytix AG für eventuelle Schäden, die direkt oder indirekt aus der Dienstleistung und der Interpretation der Resultate entstehen, keine Haftung übernehmen.

Sample bx38381-201799

Seite 1 von 3

Abbildung 9: Seite 1 des Analysenberichts vom Kontrollfutter (gefüttert in Reihe A). Die Resultate der Analyse sind grau markiert. Die weiteren Seiten (2 und 3) zeigen die einzelnen Fettsäurespektren, werden hier aber nicht aufgeführt. Der Bericht wurden von Sophia Egloff zur Verfügung gestellt. Quelle: Biolytix AG, Witterswil, Schweiz.

Biolytix AG
Molecular
Biological Analysis

Benkenstrasse 254
CH-4108 Witterswil
Switzerland

Telefon +41 61 725 20 70
Telefax +41 61 725 20 71

www.biolytix.ch
mailbox@biolytix.ch



ZHAW
Frau Sophia Egloff
Grüntal
8820 Wädenswil

Analysenbericht



SWISS
TESTING
LABS

ISO/IEC 17025
Association of Swiss Laboratories
Verband Schweizer Laboratorien
Association des Laboratoires Suisses
Associazione dei Laboratori Svizzera

Auftragsdatum: 10. April 2017 Witterswil, 09. Mai 2017
Probeneingang: 12. April 2017

bx Nr.: bx38381-201800
Probenbezeichnung: Futter B Porph / Nanno
Proben ID: 2

Resultate

Wassergehalt (§64LFGB L17.00-1,mod)	5.5	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Asche (§ 64 LFGB L 17.00-3, mod)	5.7	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fett	11.2	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fettsäure, gesättigt	2.4	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fettsäure, ungesättigt	4.4	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fettsäure, mehrfach ungesättigt	3.5	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Gesamtprotein Nx6.25	37.7	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Kohlenhydrate (berechnet)	36.5	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Energiewert, kJ (berechnet)	1704	[kJ/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Energiewert, kcal (berechnet)	405	[kcal/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Zucker, gesamt	0.51	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fructose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Glucose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Saccharose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Maltose	0.51	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Lactose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Natrium (DIN EN ISO 11885-E22)	0.47	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
NaCl (berechnet aus Natrium)	1.2	[g/100g]	externe Analyse akkreditiertes Partnerlabor
Rohfaser (VDLUF 6.1.1)	3.3	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor

Chemische/Physikalische Analytik	Messwert	Einheit
Fettsäurespektrum		
Fettsäuren, trans-	<0.1	g/100 g

Hinweis: *diese Methode ist nicht im akkreditierten Bereich

Angaben zu den angewandten Methoden und Messunsicherheiten können bei der biolytix AG erfragt werden.
Ohne schriftliche Genehmigung der biolytix AG darf dieser Bericht nicht auszugsweise kopiert werden.

Disclaimer: Das Resultat bezieht sich nur auf das untersuchte Muster. Biolytix AG führt sämtliche Arbeiten mit der grösstmöglichen Sorgfalt und unter Berücksichtigung der neusten wissenschaftlichen Forschung und Methode aus. Trotzdem kann biolytix AG für eventuelle Schäden, die direkt oder indirekt aus der Dienstleistung und der Interpretation der Resultate entstehen, keine Haftung übernehmen.

Sample bx38381-201800

Seite 1 von 3

Abbildung 10: Seite 1 des Analysenberichts vom Futter Nanno/Porph, das in Reihe B gefüttert wurde. Die Resultate der Analyse sind grau markiert. Die weiteren Seiten (2 und 3) zeigen die einzelnen Fettsäurespektren, werden hier aber nicht aufgeführt. Der Bericht wurde von Sophia Egloff zur Verfügung gestellt. Quelle: Biolytix AG, Witterswil, Schweiz.

Biolytix AG
Molecular
Biological Analysis

Benkenstrasse 254
CH-4108 Witterswil
Switzerland

Telefon +41 61 725 20 70
Telefax +41 61 725 20 71

www.biolytix.ch
mailbox@biolytix.ch



ZHAW
Frau Sophia Egloff
Grüntal
8820 Wädenswil

Analysenbericht



SWISS
TESTING
LABS

ISO/IEC 17025
Association of Swiss Laboratories
Verband Schweizer Laboratorien
Association des Laboratoires Suisses
Associazione dei Laboratori Svizzera

Auftragsdatum: 10. April 2017
Probeneingang: 12. April 2017

Witterswil, 09. Mai 2017

bx Nr.: bx38381-201801
Probenbezeichnung: Futter C Iso / Nanno
Proben ID: 3

Resultate

Wassergehalt (§64LFGB L17.00-1,mod)	5.1	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Asche (§ 64 LFGB L 17.00-3, mod)	6.2	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fett	11.1	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fettsäure, gesättigt	2.3	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fettsäure, ungesättigt	4.4	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fettsäure, mehrfach ungesättigt	3.4	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Gesamtprotein Nx6.25	38.2	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Kohlenhydrate (berechnet)	37.0	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Energiewert, kJ (berechnet)	1709	[kJ/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Energiewert, kcal (berechnet)	406	[kcal/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Zucker, gesamt	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Fructose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Glucose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Saccharose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Maltose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Lactose	<0.50	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Natrium (DIN EN ISO 11885-E22)	0.78	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
NaCl (berechnet aus Natrium)	1.9	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor
Rohfaser (VDLUF 6.1.1)	2.4	[g/100g]	externe Analyse durch akkreditiertes Partnerlabor

Chemische/Physikalische Analytik	Messwert	Einheit
Fettsäurespektrum		
Fettsäuren, trans-	<0.1	g/100 g

Hinweis: *diese Methode ist nicht im akkreditierten Bereich
Angaben zu den angewandten Methoden und Messunsicherheiten können bei der biolytix AG erfragt werden.
Ohne schriftliche Genehmigung der biolytix AG darf dieser Bericht nicht auszugsweise kopiert werden.

Disclaimer: Das Resultat bezieht sich nur auf das untersuchte Muster. Biolytix AG führt sämtliche Arbeiten mit der grösstmöglichen Sorgfalt und unter Berücksichtigung der neusten wissenschaftlichen Forschung und Methode aus. Trotzdem kann biolytix AG für eventuelle Schäden, die direkt oder indirekt aus der Dienstleistung und der Interpretation der Resultate entstehen, keine Haftung übernehmen.

Sample bx38381-201801

Seite 1 von 3

Abbildung 11: Seite 1 des Analysenberichts vom Futter Iso/Nanno, das in Reihe C gefüttert wurde. Die Resultate der Analyse sind grau markiert. Die weiteren Seiten (2 und 3) zeigen die einzelnen Fettsäurespektren, werden hier aber nicht aufgeführt. Der Bericht wurde von Sophia Egloff zur Verfügung gestellt. Quelle: Biolytix AG, Witterswil, Schweiz.

Anhang 3: Rohdaten

Tabelle 6: Rohdaten zum Fettgehalt [% TS] der Versuchsfische, zur Verfügung gestellt durch Constanze Pietsch-Schmied.

Becken	Kolben	Gewicht Probe	Kolben nach Extraktion	% Fett	Mittelwert (% Fett) pro Becken
A1	103.225	1.0518	103.441	20.82	17.93
A1	127.329	1.0392	127.483	15.03	
A2	101.211	0.9795	101.403	19.88	19.62
A2	162.695	1.0528	162.896	19.36	
A3	104.981	1.0106	105.202	22.04	21.22
A3	105.171	0.9982	105.373	20.40	
B1	103.281	1.0074	103.613	32.96	31.62
B1	101.282	1.0733	101.607	30.29	
B2	101.22	1.0441	101.546	31.22	30.53
B2	163.377	1.0559	163.692	29.83	
B3	125.958	1.021	126.32	35.46	34.81
B3	160.278	1.001	160.62	34.17	
C1	102.534	0.9983	102.766	23.24	29.33
C1	196.923	0.9682	197.266	35.43	
C2	106.005	0.9809	106.238	23.75	20.19
C2	103.956	1.0108	104.124	16.62	
C3	103.266	1.0009	103.601	33.47	30.59
C3	114.955	1.003	115.233	27.72	

Tabelle 7: Rohdaten zur histopathologischen Bewertung der Milz pro Versuchsfutter. Angegeben sind die prozentualen Flächenanteile der MAs aller Stichproben. Blau markiert sind die Mittelwerte pro Fisch und grün markiert sind die Mittelwerte eines Beckens.

Becken- und Fischnummer	Kontrollfutter (Reihe A)	Futter Nanno/Porph (Reihe B)	Futter Iso/Nanno (Reihe C)
Becken 1 Fisch 1	0.67%	0.74%	0.32%
Becken 1 Fisch 1	0.64%	0.48%	0.40%
Becken 1 Fisch 1	0.93%	0.45%	0.26%
Becken 1 Fisch 1	0.41%	0.56%	0.43%
Becken 1 Fisch 1	0.54%	0.40%	0.22%
Becken 1 Fisch 1	0.64%	0.53%	0.33%
Becken 1 Fisch 2	0.41%	0.43%	0.32%
Becken 1 Fisch 2	0.88%	0.58%	0.32%
Becken 1 Fisch 2	0.79%	0.44%	0.22%
Becken 1 Fisch 2	0.87%	0.34%	0.40%
Becken 1 Fisch 2	0.72%	0.67%	0.17%
Becken 1 Fisch 2	0.74%	0.49%	0.29%
Becken 1	0.69%	0.51%	0.31%
Becken 2 Fisch 1	0.47%	0.34%	0.28%
Becken 2 Fisch 1	0.46%	0.55%	0.16%
Becken 2 Fisch 1	0.16%	0.46%	0.27%
Becken 2 Fisch 1	0.60%	0.41%	0.20%
Becken 2 Fisch 1	0.91%	0.24%	0.22%
Becken 2 Fisch 1	0.52%	0.40%	0.23%
Becken 2 Fisch 2	0.32%	0.25%	0.28%
Becken 2 Fisch 2	0.21%	0.24%	0.28%
Becken 2 Fisch 2	0.17%	0.19%	0.19%
Becken 2 Fisch 2	0.20%	0.23%	0.24%
Becken 2 Fisch 2	0.39%	0.13%	0.21%
Becken 2 Fisch 2	0.26%	0.21%	0.24%
Becken 2	0.39%	0.30%	0.23%
Becken 3 Fisch 1	0.56%	1.24%	0.18%
Becken 3 Fisch 1	0.36%	1.00%	0.21%
Becken 3 Fisch 1	0.53%	0.49%	0.22%
Becken 3 Fisch 1	0.95%	0.60%	0.21%
Becken 3 Fisch 1	1.65%	1.16%	0.23%
Becken 3 Fisch 1	0.81%	0.90%	0.21%
Becken 3 Fisch 2	0.50%	1.03%	0.23%
Becken 3 Fisch 2	0.50%	0.47%	0.19%
Becken 3 Fisch 2	1.20%	0.93%	0.12%
Becken 3 Fisch 2	0.88%	1.17%	0.19%
Becken 3 Fisch 2	0.46%	0.78%	0.18%
Becken 3 Fisch 2	0.71%	0.88%	0.18%
Becken 3	0.76%	0.89%	0.20%

Tabelle 8: Rohdaten zur histopathologischen Bewertung der Leber pro Versuchsfutter. Dargestellt sind die Werte der Stichproben zum Leberzustand, blau markiert sind die Mittelwerte pro Fisch und rot markiert sind die Mittelwerte eines Beckens.

Becken- und Fischnummer	Kontrollfutter (Reihe A)	Futter Nanno/Porph (Reihe B)	Futter Iso/Nanno (Reihe C)
Becken 1 Fisch 1	3	3	3
Becken 1 Fisch 1	3	3	3
Becken 1 Fisch 1	3	3	3
Becken 1 Fisch 1	3	3	3
Becken 1 Fisch 1	3	3	3
Becken 1 Fisch 1	3.00	3.00	3.00
Becken 1 Fisch 2	3	3	2
Becken 1 Fisch 2	3	3	2
Becken 1 Fisch 2	3	3	2
Becken 1 Fisch 2	3	2	2
Becken 1 Fisch 2	3	3	2
Becken 1 Fisch 2	3.00	2.80	2.00
Becken 1	3.00	2.90	2.50
Becken 2 Fisch 1	2	2	3
Becken 2 Fisch 1	2	2	3
Becken 2 Fisch 1	2	2	3
Becken 2 Fisch 1	2	3	3
Becken 2 Fisch 1	3	2	3
Becken 2 Fisch 1	2.20	2.20	3.00
Becken 2 Fisch 2	3	2	2
Becken 2 Fisch 2	3	2	3
Becken 2 Fisch 2	3	3	3
Becken 2 Fisch 2	3	3	3
Becken 2 Fisch 2	3	3	3
Becken 2 Fisch 2	3.00	2.60	2.80
Becken 2	2.60	2.40	2.90
Becken 3 Fisch 1	3	3	0
Becken 3 Fisch 1	3	3	2
Becken 3 Fisch 1	2	2	0
Becken 3 Fisch 1	2	2	1
Becken 3 Fisch 1	3	3	1
Becken 3 Fisch 1	2.60	2.60	0.80
Becken 3 Fisch 2	2	1	3
Becken 3 Fisch 2	2	2	2
Becken 3 Fisch 2	2	0	3
Becken 3 Fisch 2	2	1	3
Becken 3 Fisch 2	2	1	3
Becken 3 Fisch 2	2.00	1.00	2.80
Becken 3	2.30	1.80	1.80

Anhang 4: Plagiatserklärung

ERKLÄRUNG

betreffend das selbständige Verfassen einer Bachelorarbeit im Departement Life Sciences und Facility Management

Mit der Abgabe dieser Bachelorarbeit versichert der/die Studierende, dass er/sie die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst hat.

Der/die unterzeichnende Studierende erklärt, dass alle verwendeten Quellen (auch Internetseiten) im Text oder Anhang korrekt ausgewiesen sind, d.h. dass die Bachelorarbeit keine Plagiate enthält, also keine Teile, die teilweise oder vollständig aus einem fremden Text oder einer fremden Arbeit unter Vorgabe der eigenen Urheberschaft bzw. ohne Quellenangabe übernommen worden sind.

Bei Verfehlungen aller Art treten Paragraph 39 und Paragraph 40 der Rahmenprüfungsordnung für die Bachelor- und Masterstudiengänge an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften vom 29. Januar 2008 sowie die Bestimmungen der Disziplinarmaßnahmen der Hochschulordnung in Kraft.

Ort, Datum:

Unterschrift:

Buchs SG, 06.09.2017



.....

.....

Poster

Für einen allfälligen A4 Ausdruck ist das Poster zu der vorliegenden Arbeit auf der kompletten nächsten Seite dargestellt.

Einfluss von Mikroalgen-Fütterung auf das Wachstum und die Gesundheit von Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Einleitung

Fischmehl ist ein wesentlicher Bestandteil von Aquakultur-Futtermitteln. Immer mehr Versuche werden jedoch unternommen, um diesen Bestandteil im Fischfutter zu ersetzen [1]. Algen (Mikro- und Makroalgen) könnten als Alternative dafür dienen [2]. In Aquakulturen können verschiedenste Einflüsse die Fischgesundheit beeinträchtigen [3], wobei die Histopathologie dazu genutzt werden kann, um den Gesundheitszustand von Fischen zu eruieren [4]. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein Fütterungsexperiment gemäss Egloff [5] an juvenilen Tilapias (*Oreochromis niloticus*) durchgeführt. Diesen Fischen wurden drei Versuchsfutter, die zuvor nach Seitz [6] hergestellt wurden, gefüttert. Dabei enthielt das Futter Nanno/Porph die Mikroalgen *Nannochloropsis gaditana* und *Porphyridium sordidum*, das Futter Iso/Nanno enthielt die Mikroalgen *Isochrysis galbana* und *Nannochloropsis gaditana*. Ebenso wurde ein Kontrollfutter ohne Mikroalgenanteil hergestellt.

In der hier beschriebenen Arbeit wird der Gesundheitszustand dieser Versuchsfische anhand einer histopathologischen Untersuchung der Leber und der Milz erhoben. Ebenso werden diese Resultate mit weiteren Daten dieses Fütterungsexperiments verglichen.

Material und Methoden

Fütterungsexperiment [5]

- 9-wöchiges Fütterungsexperiment an juvenilen Tilapias (*Oreochromis niloticus*), mit insgesamt 360 Individuen
- durchgeführt in drei unabhängigen Kreisläufen, pro Versuchsfutter einer
- insgesamt 3 verschiedene Versuchsfutter, Kontrollfutter ohne Mikroalgen, Futter Nanno/Porph und Iso/Nanno mit 4 % Mikroalgenanteil
- weitere Daten: Fettgehalt der Versuchsfische, Wachstumsraten, Wachstumskurven, Hepatosomatischer Index (HSI), Splenosomatischer Index (SSI) und die Nährstoffanalysen der Versuchsfutter

Histologie

- die Leber und Milz von 6 Fischen pro Futtertyp wurden dem Institut für Fisch- und Wildtiermedizin (FIW) der Universität Bern zur Erstellung von Histologiepräparaten zugesendet [5]
- mehrere 4 µm dicke Abschnitte beider Organe wurden dort auf jeweils einem Objektträger fixiert und mit der H.E.-Färbung eingefärbt
- von jedem Objektträger (Milz und Leber) wurden unter dem Lichtmikroskop 5 Fotos von repräsentativen Ausschnitten aufgenommen (bei 100facher Vergrößerung)
- die histopathologische Bewertung der Milz beinhaltete die Quantifizierung der Makrophagen-Aggregate (MAs) als prozentualen Anteil zum Milzgewebe [7] anhand von ImageJ
- die histopathologische Bewertung der Leber wurde anhand einer Bewertungsskala (Abbildung 1) von 0 = keine Veränderung bis 3 = starke Veränderung gemäss Zdzrow [8], abgeändert nach Pietsch [9], durchgeführt

Resultate

Fütterungsexperiment

- Fettgehalt der Versuchsfische (% der Trockensubstanz) beim Kontrollfutter = 19.59 ± 1.6 %, beim Futter Nanno/Porph = 32.32 ± 2.2 % und beim Futter Iso/Nanno = 26.70 ± 5.7 %, signifikante Unterschiede nur zwischen dem Kontrollfutter und Futter Nanno/Porph
- der Fettgehalt aller Versuchsfutter lag zwischen 11.1 und 11.2 %
- Resultate der organosomatischen Indizes [5] sind in Tabelle 1 abgebildet
- die berechneten Wachstumsraten waren beim Kontrollfutter 4.4 ± 0.1 % pro Tag, beim Futter Nanno/Porph 5.0 ± 0.1 % pro Tag und beim Futter Iso/Nanno 5.3 ± 0.1 % pro Tag [5], die Wachstumskurven dazu sind in Abbildung 2 ersichtlich

Tabelle 1: Auswertungen der organosomatischen Indizes (HSI und SSI) [5], unterschiedliche Buchstaben hinter einem Wert zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsfütterungen an.

Index	Kontrollfutter	Futter Nanno/Porph	Futter Iso/Nanno	Samplingtyp
HSI [%]	4.4 ± 1.3	4.1 ± 1.3	4.1 ± 1.3	Zwischensampling
HSI [%]	4.2 ± 0.6	3.8 ± 0.9	4.0 ± 0.8	Schlussampling
SSI [%]	0.4 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.1 ^{a,b}	0.8 ± 0.2 ^b	Schlussampling

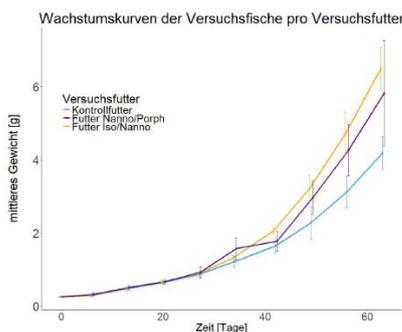


Abbildung 2: Darstellung der Wachstumskurven pro Versuchsfutter, dargestellt als mittleres Gewicht der Versuchsfische über die Anzahl Tage (63 insgesamt) [5], durch Andreas Seitz bearbeitet.

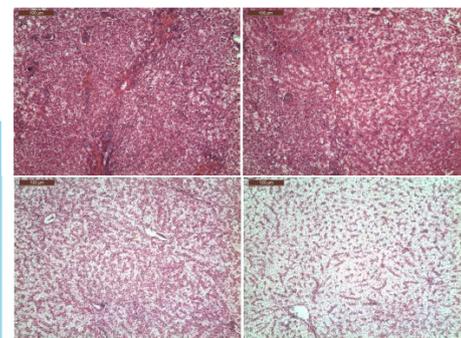


Abbildung 1: Bewertungsskala für die histopathologische Bewertung der Leber, Aufnahmen bei 100facher Vergrößerung. Bild oben links: Zustand ohne histologische Veränderungen (Bewertung = 0). Bild oben rechts: Zustand mit schwachen histologischen Veränderungen (Bewertung = 1). Bild unten links: Zustand mit mässigen histologischen Veränderungen (Bewertung = 2). Bild unten rechts: Zustand mit starken histologischen Veränderungen (Bewertung = 3). Quelle: Andreas Seitz.

Diskussion

Ein Grossteil der Fischlebern weist Verfettungen auf, dies zeigt sich auch in der relativ hohen Bewertung des Leberzustandes. Der HSI und der SSI sind gegenüber anderen Studien [10, 11] erhöht. Es können negative lineare Korrelationen zwischen den Messparametern HSI-Fettgehalt der Fische, SSI-Flächenanteil der MAs und Bewertung der Leber-Fettgehalt der Fische nachgewiesen werden. Dennoch wuchsen die Fische, die algenhaltiges Futter erhielten signifikant besser als die Kontrollgruppe [5]. Trotz der nicht signifikanten Unterschiede weisen die Fische, die Kontrollfutter erhielten, immer den grössten Wert bei den histopathologischen Bewertungen auf. Diese Werte scheinen auch die Wachstumsraten zu widerspiegeln. Dennoch kann die Leber durch Verfettungen degenerieren und zum Tod eines Fisches führen [12]. Während dem Sezieren für die Organentnahme wurden jedoch auch keine inneren Anzeichen für Erkrankungen festgestellt (Abbildung 5). Dieser Umstand und die guten Wachstumsraten [5] lassen den Schluss zu, dass trotz der verfetteten Lebern, die Fische keinen krankhaften Zustand aufweisen. Die hohen HSI könnten auf einen Energieüberschuss im Versuchsfutter hinweisen, die hohen SSI auf ein erhöhtes Stresslevel. Um diese These zu prüfen wären weitere Untersuchungen nötig.



Abbildung 5: Versuchsfisch (*O. niloticus*) vor der Organentnahme. Quelle: Andreas Seitz

Histopathologische Bewertung der Milz

- Fische unter dem Kontrollfutter wiesen den grössten prozentualen Flächenanteil der MAs, am Milzgewebe, mit 0.61 ± 0.2 % auf. Fische die das Futter Nanno/Porph erhielten = 0.57 ± 0.3 %, Fische die das Futter Iso/Nanno erhielten = 0.24 ± 0.1 %, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Futtertypen (Abbildung 3)

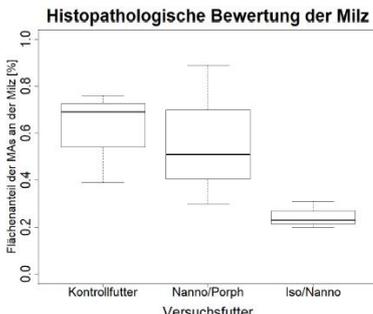


Abbildung 3: Histopathologische Bewertung der Milz, abgebildet sind die prozentualen Flächenanteile der MAs am gesamten Milzgewebe pro Versuchsfütterung.

Histopathologische Bewertung der Leber

- Mehrheit der Fische wiesen, unabhängig von der Versuchsfütterung, eine Leberzellverfettung (Fetteinlagerung in den Hepatozyten) und teilweise Vakuolisierungen im Gewebe auf (Abbildung 4)
- histopathologische Bewertung der Leber fiel dementsprechend hoch aus, Fische die Kontrollfutter erhielten = 2.63 ± 0.4, Futter Iso/Nanno = 2.40 ± 0.9, Nanno/Porph = 2.37 ± 0.7, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsfütterungen

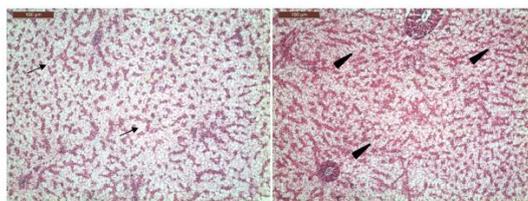


Abbildung 4: Beispiele für Leberzellverfettungen (Pfeile) und Vakuolisierungen (Dreiecke). Aufnahmen bei 100facher Vergrößerung. Quelle: Andreas Seitz.

Quellen

[1] Lim C. E., & Webster C. D. (2006). Nutrient Requirements. In C. E. Lim, & C. D. Webster (Hrsg.), *Tilapia: Biology, Culture, and Nutrition*. (S. 469-501) The Haworth Press.
[2] Henry, E. C. (2012). The use of algae in fish feeds as alternatives to fishmeal. *International Aquafeed*, 5, 10-13.
[3] Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104, S. 199-235.
[4] Handy, R. D., Runnals, T., & Russell, R. M. (2002). Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in southern England that meet the Freshwater Fisheries Directive. *Ecotoxicology*, 11(6), S. 467-479.
[5] Egloff, S. (2017). *Algenhaltiges Fischfutter – Kultivierung von Mikroalgen und Fütterungsversuche mit juvenilen Tilapia (*Oreochromis niloticus*)*. (Master Thesis). ZHAW Life Sciences and Facility Management, Wädenswil.
[6] Seitz, A. (2017). *Verwendung von Mikroalgen für die Fischfutterherstellung – Nährstoffzusammensetzung und Analyse von drei verschiedenen Mikroalgen (*Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Porphyridium sordidum*)*. (Semesterarbeit 2). ZHAW Life Sciences and Facility Management, Wädenswil.

[7] Ledi-Neto, J., Dotta, G., Garcia, P., Brum, A., Gonçalves, E. L. T., & Martins, M. L. (2014). Haematology and melanomacrophage centers of Nile tilapia fed supplemented diet with propolis. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 36(3), S. 263-269.
[8] Zdzrow, J. M., Stegeman, J. L., & Tangway, R. L. (2004). Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 68, S. 25-38.
[9] Pietsch, C., Schulz, C., Rovira, P., Moas, W., & Burkhardt-Holm, P. (2014). Organ Damage and Hepatic Lipid Accumulation in Carp (*Cyprinus carpio* L.) after Feed-Borne Exposure to the Mycotoxin, Deoxynivalenol (DON). *Toxins*, 6, S. 756-778.
[10] Richter, N., Siddharaju, P., & Becker, K. (2003). Evaluation of nutritional quality of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*, 217, S. 599-611.
[11] Marzouk, M. S., Moustafa, M. M., & Mohamed, N. M. (2008). Evaluation of immunomodulatory effects of some probiotics on cultured *Oreochromis niloticus*. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, S. 1043-1058.
[12] Amlicher, E. (1992). *Taschenbuch der Fischkrankheiten: Grundlagen der Fischpathologie* (6. Ausg.). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.