

Sachbericht zum Verwendungsnachweis SensoFiA

Kurzbericht



Zuwendungsempfänger	Nordischer Maschinenbau Rudolf Baader GmbH & Co. KG (BAADER)
Förderkennzeichen	031B0915K2
Vorhaben	SensoFiA – Sensorentwicklung für die Evaluierung der Haltung, Gesundheit und Produktqualität von Fischen in differenten Aquakultursystemen
Laufzeit des Vorhabens	01. Dezember 2020 – 30. September 2023
Projektleitung	Dennis Lohmann, Tel: 0049 451 5302 220 E-Mail: Dennis.Lohmann@baader.com Ursprünglich: Bodo Hensen und Dr. Pia Meinlschmidt

gefördert durch



Der Autor ist für den Inhalt verantwortlich.

Titel: SensoFiA – Sensorenentwicklung für die Evaluierung der Haltung, Gesundheit und Produktqualität von Fischen in differenten Aquakultursystemen

Autoren: Kolbe I.¹⁾, Lohmann D.²⁾, Gebert M¹⁾

Einleitung:

Das Projekt SensoFiA wurde mit dem Ziel initiiert, messbare Stressparameter in Fischen zu ermitteln und ein entsprechendes Sensorsystem zu entwickeln, um in Aufzucht- und Schlachtbetrieben Fischstress und das Tierwohl schnell zu evaluieren. In SensoFiA arbeiteten die Forschungseinrichtung Fraunhofer IMTE, früher EMB, und der Maschinenbau Betrieb Nordischer Maschinenbau Rud. Baader GmbH und Co. KG, beide ansässig in Lübeck, zusammen. Grundlage für das Testsystem in SensoFiA sollten im Schwesterprojekt BioFiA durchgeführte Tierversuche bilden. Durch stresshafte Auslenkungsversuche (Ernährung, Sauerstoff- und Temperaturschwankungen) war geplant Atlantische Lachse (*Salmo salar*) gezielt im physiologischen Rahmen zu stressen. Parallel sollten von den beprobten Lachsen in Zellkulturen verschiedener Organe angelegt und kultiviert werden. Die in BioFiA ermittelten Stressmarker hätten dann in der Zellkultur auf ihre Robustheit getestet und der Plan für die Anwendung im Feld festgelegt werden sollen. Der Kontakt zu den Industriekunden sollte dabei über die Firma BAADER organisiert werden. Die Entscheidung für den Atlantischen Lachs als Versuchsorganismus war auch in Hinsicht darauf gewählt, dass ein Großteil der BAADER Kunden mit dieser Art arbeitet und der Stresstest so perfekt auf die Zielgruppe ausgelegt ist.

Verbindung zur industriellen Verarbeitung:

Moderne Fischproduktionsbetriebe sind hoch technologisiert und automatisiert. Diese Unternehmen investieren beträchtliche Summen und Energie, um stressfreie Verarbeitungsmethoden zu entwickeln, da gestresste Fische im Endprodukt häufig erhebliche Mängel aufweisen, was wiederum zu verminderten Preisen führt. Daher liegt ein besonderer Fokus darauf, die Produktionskette zu optimieren, um die Qualität der Produkte zu gewährleisten und gleichzeitig die Rentabilität der Betriebe zu steigern. Eine schnelle Stressmessung wäre der Schlüssel, um Rückschlüsse auf Stress erzeugende Prozessparameter zu ziehen. Dazu gehören beispielsweise das Pumpverhalten, die Enge in den Netzen, pH-Werte, Temperaturen, Lichteinfluss, Geräusche oder die Wasserqualität. Durch die genaue Überwachung und Anpassung dieser Parameter können die Betriebe sicherstellen, dass die Fische unter optimalen Bedingungen aufgezogen und verarbeitet werden, was letztendlich zu qualitativ hochwertigen Endprodukten führt.

Projektverlauf und Ergebnisse:

Das Fraunhofer IMTE war als wissenschaftlicher Partner für die Durchführung von Fischzellkulturen und molekularbiologische Untersuchungen verantwortlich. Fischzellen sind

sehr anspruchsvoll und für jede Art und jedes Organ müssen Isolations- und Kultivierungsbedingungen jeweils optimiert werden. Die ist für die Kulturen aus Hirn, Leber, Kopfnieren und Haut geglückt. Trotzdem konnten viele geplante Versuche und Beprobungen nicht, oder erst sehr spät durchgeführt werden. Pandemiebedingt mussten auch die Versuchspläne von BioFiA umgestaltet werden und die Projektverläufe von SensoFiA und BioFiA, entwickelten sich so stark auseinander, dass SensoFiA neu aufgebaut und von BioFiA entkoppelt wurde. In Bezug auf Feldversuche gestaltete sich auch der Besuch bei Lachsproduzenten schwierig, da ein Besuch unter sehr strengen Lock Down Regeln in Norwegen und den Färöer-Inseln nicht möglich war. Im Laufe der Projektlaufzeit konnte leider nur ein Feldversuch in Norwegen realisiert werden.

Stressparameter-Evaluation:

Glücklicherweise konnte auf aktuelle Veröffentlichungen zu Thema Fisch Stress zurückgegriffen werden. Ausgewählte mRNA-Marker konnten an den neuen Zellkulturen getestet und die vielversprechendsten Kandidaten für den Feldversuch ausgewählt werden. Aufgrund der Unmöglichkeit, Gewebe von den Lachsen im Feld zu entnehmen, wurde ein patentiertes Verfahren des Fraunhofer-Instituts genutzt, um mRNA aus dem Haltungswasser zu isolieren. Der Entscheidende Faktor bei dieser Methode ist die Stabilisierung der mRNA im Haltungswasser. Dieses Verfahren musste jedoch zunächst an die Feldbedingungen angepasst werden. Der Stabilisator ist sehr giftig und liegt in Pulverform vor, daher war das Benutzen von diesem Stoff in direkter Nähe zu Speisefischen nicht möglich. Zusätzlich konnte der Transport bei -80°C von Norwegen nach Deutschland nicht gewährleistet werden und es musste auf einen Stabilisator, der bei Raumtemperatur genutzt werden kann, zurückgegriffen werden. Unter Laborbedingungen verliefen die Tests mit diesem Stabilisator erfolgreich. Für die im Betrieb genommenen Proben waren leider keine aussagekräftigen Ergebnisse zu gewinnen. Der längere Transport, Temperaturschwankungen und eventuell eine andere Wasserkomposition (höherer Salzgehalt) könnten zu einer Degeneration der mRNA beigetragen haben. Ein zweiter Feldversuch, bei dem die Stellschrauben für die Probennahme verändert werden können, konnte leider nicht durchgeführt werden.

Fazit und Ausblick:

Obwohl das Projekt SensoFiA durch die Corona-Pandemie und die damit verbundenen Einschränkungen erheblich beeinträchtigt wurde, konnten wichtige Schritte zur Stressparameter-Evaluation auf molekularer Ebene im Labor durchgeführt werden. Die Nutzung von Veröffentlichungen und die Anpassung vorhandener Verfahren waren entscheidend, um die Forschung trotz der Widrigkeiten voranzutreiben. Die Pandemiebedingten Einschränkungen und Verzögerungen konnten jedoch nicht aufgeholt werden und so konnte bis zum Ende der Projektlaufzeit leider kein Prototyp für einen on-site Stresstest entwickelt werden.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis SensoFiA

Eingehende Darstellung



Zuwendungsempfänger	Nordischer Maschinenbau Rudolf Baader GmbH & Co. KG (BAADER)
Förderkennzeichen	031B0915K2
Vorhaben	SensoFiA – Sensorentwicklung für die Evaluierung der Haltung, Gesundheit und Produktqualität von Fischen in differenten Aquakultursystemen
Laufzeit des Vorhabens	01. Dezember 2020 – 30. September 2023
Projektleitung	Dennis Lohmann, Tel: 0049 451 5302 220 E-Mail: Dennis.Lohmann@baader.com Ursprünglich: Bodo Hensen und Dr. Pia Meinlschmidt

gefördert durch



Der Autor ist für den Inhalt verantwortlich.

Titel: SensoFiA – Sensorenentwicklung für die Evaluierung der Haltung, Gesundheit und Produktqualität von Fischen in differenten Aquakultursystemen

Autoren: Kolbe I.¹⁾, Lohmann D.²⁾, Gebert M¹⁾

Das Projekt SensoFiA war in zwei Aspekte geteilt. Den Industriellen Part, repräsentiert durch die Firma Rud. BAADER GmbH & Co. KG und den wissenschaftlichen Part mit der Fraunhofer Einrichtung IMTE. Aufgabe von BAADER war es die Bedürfnisse ihrer Kunden in Bezug auf einen Stresstest zu evaluieren und eine Bestandsanalyse zu erfassen. Im späteren Verlauf des Projektes wurde durch BAADER der Besuch bei den Kunden vor Ort ermöglicht und zu organisiert, um den Test selbst in eine erste Anwendung zu bringen. Aufgabe von Fraunhofer IMTE war es anhand der vorgegebenen Parameter der Kunden die wissenschaftlichen Vorarbeiten für eine Testentwicklung zu erarbeiten.

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Es konnte leider nur ein Bruchteil der ursprünglich angedachten Reisen und damit verbundenen Analysen durchgeführt werden. Durch Umstrukturierung des gesamten Versuchsaufbaus konnten alle laborbedingten Analysen an das Fraunhofer IMTE verlegt werden und die Neuausstattung für die Firma BAADER eingespart werden. Weitere Einschränkungen der Pandemiephase wurden durch erhöhte Vorarbeit in der Zellkultur und mehr Personalstunden aufgefangen.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Notwendigkeit von Stressmessung in der Fischindustrie: Lachse sind eine ökonomisch überaus wichtige Fischart. Sie werden in Massen gezüchtet gehalten und geschlachtet. Sie sind aber auch eine anspruchsvolle Art, die empfindlich auf Stress reagiert. Stress beeinflusst ihre Reproduktion, das Wachstum, die Immunabwehr und nicht zuletzt die Fleischqualität. Daher ist Stress ein wichtiges Thema in der Aquakultur und im Fischereiwesen. Es wird zwischen akutem und chronischem Stress unterschieden. Akuter Stress wird durch kurzfristige Veränderungen hervorgerufen. Er löst die Freisetzung von Adrenalin, Cortisol und Energie aus, um eine mögliche Flucht zu unterstützen. Nach Abklingen der Stresssituation kehrt der Körper wieder in seine natürliche Homöostase zurück. Chronischer Stress tritt auf, wenn die Stressauslöser dauerhaft auf die Fische einwirken, wodurch der Cortisolspiegel dauerhaft erhöht wird und Langzeitauswirkungen auf Wachstum und Immunabwehr gezeigt werden. Einzelne Faktoren, die Stress auslösen, wie Temperaturveränderungen, pH-Werte, Sauerstoffsättigung können kontinuierlich überwacht werden, aber Stressmessung an sich ist

immer noch mit hohem Aufwand verbunden und zum Teil ist die Stressmessung an sich schon Stress auslösend für den Fisch. Die Überwachung von Stress und den auslösenden Faktoren ist für Lachsproduzenten entscheidend, um optimale Bedingungen für die Tiere herzustellen und ein möglichst hochwertiges Produkt zu erhalten.

Eine Schlüsselmethode zur Stresserkennung bei Lachsen ist die Analyse von Verhaltensmustern. Gestresste Lachse zeigen oft auffällige Verhaltensänderungen, wie vermehrtes Schwimmen an der Wasseroberfläche, verminderte Futteraufnahme oder unkoordinierte Bewegungen. Moderne Überwachungssysteme in Aquakultureinrichtungen nutzen hochentwickelte Kameras und Bildverarbeitungstechnologien, um solche Veränderungen zu erkennen und frühzeitig auf Stressreaktionen zu reagieren.

Ein weiterer Ansatz ist die biochemische Stresserkennung. Gestresste Lachse produzieren Stresshormone wie Cortisol und Adrenalin in erhöhten Mengen. Durch leicht bis intensive invasive Probeentnahmetechniken, wie Schleimhautabstrichen bis Fischblutentnahme, ermöglichen die quantitative Bestimmung dieser Hormone. Fortschritte in der Labortechnik ermöglichen eine schnelle und präzise Analyse, wodurch eine zeitnahe Intervention bei stressbedingten Problemen möglich ist. Die Probennahme selbst setzt die Fische jedoch auch unter Stress und muss von geschultem und routiniertem Personal durchgeführt werden. Adrenalin wird zusätzlich schnell abgebaut und schwankt sehr stark in seinen Konzentrationen. Der Cortisolspiegel kann auch aufgrund von Langzeitstress erhöht sein und als Einzelmesswert eventuell falsch eingeordnet werden. Zusätzlich schwankt die Cortisol Ausschüttung auf natürliche Weise im Tagesverlauf, mit hohen Konzentrationen am Morgen und abfallenden Konzentrationen im Laufe des Tages.

Die Umweltüberwachung spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Stresserkennung. Faktoren wie Wasserqualität, Temperatur und Sauerstoffgehalt beeinflussen den Gesundheitszustand von Lachsen erheblich. Automatisierte Sensornetzwerke in Fischfarmen überwachen kontinuierlich diese Umweltbedingungen und können so frühzeitig auf potenzielle Stressquellen hinweisen. Insgesamt wird die Stresserkennung bei der Lachsaufzucht, schon intensiv von modernen Technologien und wissenschaftliche Erkenntnisse unterstützt. Daten zu Gesundheit und Wohlbefinden von Fischpopulationen in Aquakulturanlagen engmaschig erfasst und ausgewertet.

Bei Stressfaktoren, die während der Fischverarbeitung auftreten, wird die Situation noch schwieriger. Es tritt vor allem Akuter Stress auf, der mit den bisherigen Verfahren nur sehr aufwendig und nicht im laufenden Prozess messbar ist. Von Besonderer Bedeutung ist dieser Kurzzeitstress, da die Veränderungen in der Homöostase der Fische nicht wieder regeneriert werden kann, da die Fische vorher geschlachtet werden. Stress in dieser Phase ist von starkem Interesse, da er die Fischverarbeitungsindustrie beeinflusst. Neben sich verschärfenden, gesetzlichen Vorschriften treibt auch das wachsende Interesse von

Unternehmen für intelligenten Anwendungen beim Umgang mit Fischen und humanes Töten und Ausblutung die Forschung voran. Im Fokus steht aber die Auswirkungen von Stress auf Fische und deren Fleischqualität.

Ursachen für Stress in der Fischverarbeitung: Die technische Entwicklung hat den Fischfang effizienter gemacht, die schnelle Verarbeitung führt jedoch zu Stresssituationen für die Fische. Der enorme Durchsatz erfordert es, dass die Tiere transportiert werden müssen. Dafür werden sie zunächst in ihren Haltungskäfigen stark verdichtet, um in Transportboote hinein und später wieder hinaus gepumpt zu werden. Während des Transportes und beim Be- und Entladen wird der Zustand der Fische und der des Wassers an Board konstant gemessen und beobachtet. Die Pumprate wird dann direkt manuell angepasst, wenn einer der gemessenen Parameter für eine starke Stressentwicklung spricht. Vor allem der Sauerstoffgehalt des Wassers und das Schwimmverhalten der Tiere dienen als Indikator. In den Pumpschläuchen selbst wird nicht gemessen. Genau in diesem Vorgang wird aber eine hohe Stressursache gesehen. Dieses Handling der Tiere beim Transport zwischen den einzelnen Standorten ist der Bereich, in dem der größte Bedarf für ein Stressmonitoring gesehen wird, da dort die bisher ergriffenen Maßnahmen nicht angewendet werden können. Das Schwimmverhalten der Tiere ist beim Verdichten und beim Pumpen nicht natürlich und kann nicht mehr als Indikator für weitere Verbesserungen in der Stressreduzierung herangezogen werden. Die Betäubung und Tötung der Tiere erfolgen maschinell. Dabei dient ein Schlag auf den Kopf der Betäubung und der Tod wird durch Ausbluten herbeigeführt. Eine nicht ideale Betäubung hat die wohl stärkste Auswirkung auf die Tiere, da sie sich ab diesem Zeitpunkt nicht mehr im Wasser befinden. Eine Nachkontrolle durch geschultes Personal mit Überführung in einen weiteren Betäubungs- und Tötungskanal soll diese stressige Situation so kurz wie möglich halten.

Auswirkungen auf die Produktqualität: Stress beeinflusst den Stoffwechsel der Fische und damit die Fleischqualität. Neben akuten physiologischen Reaktionen führt chronischer Stress zu geringerem Wachstum und geschwächtem Immunsystem. Stressbedingt können Verletzungen und Einblutungen entstehen, die die Filetqualität mindern. Auch äußere Merkmale wie Farbveränderungen am Rücken sind ebenfalls Auswirkungen. Die Auswirkungen von Akutstress vor der Schlachtung ist entscheidend für die Qualität des Endprodukts und die Rolle der richtigen Handhabung von Fischen vor der Blutung die Stellschraube für Stressreduktion.



Abbildung 1: Gaping im Fischfilet. Stress vor der Schlachtung führt zu einer schlechteren maschinellen Verarbeitung und einem Zerreißen des Fleisches. Von Nordischer Maschinenbau Rud.BAADER GmbH & Co. KG

Insgesamt ist ein ganzheitlicher Ansatz erforderlich, um die Fischverarbeitung so schonend wie möglich zu gestalten und die Qualität des Endprodukts zu erhalten. Dies erfordert nicht nur technologische Innovationen, sondern auch eine Sensibilisierung für humane Praktiken in der Fischindustrie. Hierfür ist eine schnell und eventuell kontinuierliche Messmethode eine Schlüsselkomponente. Mit ihr lassen sich Rückschlüsse ziehen, wie Prozesse schonender gestaltet werden können.



Abbildung 2: Messung des *Rigor mortis* Zustandes. Je gerader der Fisch, umso stärker der *Rigor*. Aus "Guidance for selection of textures in salmon filet", 2010, Fiskeri - oghavbruksnaeringens forskingsfond (FHF).

Die Auswirkungen von Stress auf die Qualität von Fischen sind vielfältig. Durch aufwendige Messmethoden konnten wir in Vorstudien feststellen, dass gestresste Fische schneller und intensiver in die Leichenstarre (*Rigor mortis*) übergehen (Abb. 2). Wir haben die Dauer und Intensität der Leichenstarre gemessen und die Ergebnisse in einem Diagramm (Abb. 3) dargestellt. Allerdings ist diese Messmethode weit entfernt von einer industriellen Anwendung. Sie erfordert aufgrund der Länge des *Rigor mortis* hohe Lagerkapazitäten und Kosten. Zusätzlich würde die Weitervermarktung verzögert und Zeit von der Haltbarkeit des Endproduktes abgezogen werden. Eine schnellere oder kontinuierliche Messung, die direkt auf das Endprodukt bezogen werden kann, ist derzeit nicht möglich. Somit fehlt es an Mitteln, um die Stressmessung durchzuführen und den Prozess weiter zu optimieren.

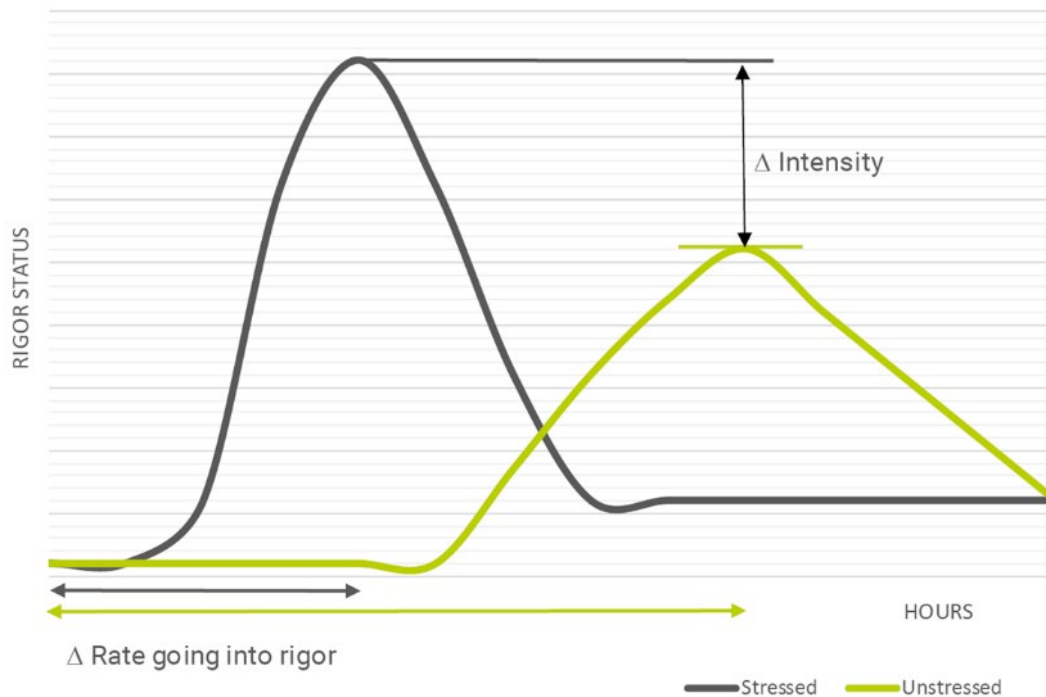


Abbildung 3: Rigor mortis Einsatz und Dauer in Abhängigkeit von der Stressexposition. Gestresste Tiere werden früher steif und schneller wieder weich. Ungestresste gehen später, in einen längeren Rigor mortis über. Von Nordischer Maschinenbau Rud. BAADER GmbH & Co. KG

Aus verarbeitungstechnischer Sicht ist ein zu schnelles Eintreten der Leichenstarre eine Herausforderung, da ein optimiertes Schlachten und frisches Filetieren nur möglich ist, bevor die Leichenstarre eintritt. Wir konnten Qualitätsmängel wie Gaping (Abb. 1), Farbveränderungen und Blutflecken feststellen. Diese Veränderungen des Endprodukts sind nicht nur unerwünscht, sondern führen auch zu einer verminderten Preiserlös.

Da ein grätenfreies Filet erst nach der Leichenstarre erzeugt werden kann, wird oft der Transportweg für die Leichenstarre genutzt, um die Produkte näher an die Verbraucherbereiche zu bringen, wo sie dann veredelt werden.

In Norwegen, insbesondere in der Lachsindustrie, werden Fische mit schlechter Qualität in der Regel aussortiert und entsorgt. Dies geschieht, um die Qualität der Produkte zu gewährleisten und das Ansehen der norwegischen Fischindustrie zu erhalten. Fische mit schlechter Qualität können verschiedene Ursachen haben, darunter Krankheiten, Stress während des Transports oder der Handhabung, unzureichende Haltung in Aquakulturen oder ungünstige Umweltbedingungen. Um die Standards für Lebensmittelsicherheit und -qualität einzuhalten, werden solche Fische normalerweise nicht für den Verzehr freigegeben und können stattdessen zu Tierfutter oder anderen Zwecken verwendet werden. Die norwegische Fischindustrie legt großen Wert auf Qualität und Nachhaltigkeit, daher werden strenge Kontrollen durchgeführt, um sicherzustellen, dass nur Produkte höchster Qualität auf den Markt gelangen.

Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses – auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft – im Sinne des Verwertungsplans

Um möglichst kontinuierlich höchste Qualität zu produzieren, müssen die industriellen Prozesse fortlaufen verbessert und optimiert werden, um sowohl ethischen als auch marktwirtschaftlichen Ansprüchen gerecht zu werden.

Fazit der Industrieanalyse: Mit den bisherigen Methoden ist es nicht möglich den Ist-Zustand noch weiter zu optimieren. Es wird dringend eine wenig invasive und schnelle Messmethode für akuten Fischstress benötigt, um industrielle Veränderungen, z.B. verschiedenen Pumpsysteme überhaupt evaluieren zu können. Daher ist es Ziel, eine schnelle und ggf. kontinuierliche Stressmessung zu entwickeln, die der Industrie die Möglichkeit gibt Rückschlüsse zu ziehen und Prozesse anzupassen.

Entwicklung eines biologischen Stresstests: Die wissenschaftliche Bearbeitung des Projektes konnte im Februar 2021 mit zwei Monaten Verzögerung beginnen. Da das Projekt auf Ergebnissen aus dem Schwesterprojekt BioFiA aufbauen sollte war ein verspäteter Start aber noch nicht als Nachteil zu werten, zumal es auch bei BioFiA Pandemiebedingt bereits zu Verzögerungen gekommen war.

Für die Evaluation der Stressmarker war geplant in SensoFiA spezifische Zellkulturen von der Zielspezies Atlantischen Lachs anzufertigen. Da wurden Organe in Betracht gezogen, die entweder im direkten Kontakt mit der Umwelt (Kieme, Haut, Flosse) stehen und dementsprechend schnell auf Umweltveränderungen reagieren und Organe, die in der direkten Stress- und Immunreaktion (Kopfnieren, Gehirn, Leber) eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu Human und Säugetierzellen gibt es für Fische keine optimierten Nährstoffmedien, weshalb die Rezeptur für jede Fischart und zum Teil auch für jedes Organ individuell angepasst werden muss. Fische sind poikilotherm, das heißt, ihre Temperatur entspricht der Umgebung und ihre Stoffwechselprozesse sind dem Temperaturspektrum ihres Lebensraums angepasst. Der Atlantische Lachs ist ein Kaltwasserfisch und dementsprechend müssen auch seine Zellen bei niedrigen Temperaturen kultiviert werden. Zu Beginn wurden daher frisch isolierte Hautzellen genutzt, um das Temperaturoptimum für Lachszellen zu bestimmen. Hautzellen wurden mit gleichem Medium versehen und bei Temperaturen von 12 ° C bis 20 ° C (in 2er Schritten) kultiviert, Wachstumskurven angefertigt und Viabilitätsvergleiche durchgeführt. Die Zellen wuchsen im Bereich von 12° C bis 18°C. Wobei sie sich bei 18°C zwar noch teilten aber sich sehr schnell ablösten und starben. Bei 20°C wuchsen keine Zellen mehr. Im Bereich von 12 - 16°C wuchsen die Zellen mit unterschiedlichen Teilungsraten (12°C = 36 Stunden, 16°C = 12 Stunden) stabil. Je höher in diesem Bereich die Temperatur lag, umso schneller teilten sie sich. Daher wurde 16°C als zukünftige Kultivierungstemperatur ausgewählt.

Geringe Wachstumsraten bei niedrigen Temperaturen stellen eine Herausforderung dar, da die Gefahr einer Kontamination mit Bakterien und Pilzen bei langsam wachsenden Kulturen erhöht ist. Bei primär isolierten Zellen aus frischem Gewebe handelt es sich um die Gefahr einer Kontamination zusätzlich erhöht, da vom Tier und dem Haltungswasser grundsätzlich auch viele Bakterien mit in den Prozess eingebracht werden. Grundsätzlich werden dem Medium auch Antibiotika und Fungizide zugesetzt, aber deren Konzentration darf auch nicht zu hoch sein, sonst würden sie die Zellen ebenfalls schädigen. So kam es regelmäßig zu Kontaminationen der Zellansätze. Zu Beginn vor allem durch Pilze. Nach Wechsel des Antimykotikums auf Normocin konnten diese aber weitestgehend eingedämmt werden.

Zellen aus Gewebe können auf unterschiedliche Arten gewonnen werden. Zum einen können Zellen eigenständig aus kleinen Gewebestücken herauswachsen, zum anderen kann die Matrix, die die Zellen umgibt, enzymatisch aufgelöst und Zellen so isoliert werden. Danach müssen die Zellen auf der Oberfläche der Kulturschalen anwachsen. Die Kulturschalen bestehen aus Plastik, eine sehr glatte Oberfläche, auf der nicht alle Zellen optimal anwachsen können. Um das Anheften zu erleichtern, wurden die Oberflächen beschichtet. Mit Schweine-Gelatine, Fisch-Gelatine und einem Fibrinigel. Die Gelatine bildet einen dünnen Film auf der Gefäßoberfläche an dem die Zellen dann besser anhaften können, während das Fibrinigel eine 3D Matrix bietet, in das die Zellen hineinwachsen können. In das Gel können Gewebe die sich, wie Kiemen, leicht vom Untergrund ablösen auch eingebettet werden. Ein wichtiger Bestandteil nahezu aller Medien ist Serum. Aufgrund seiner Gewinnung unterliegt es auch Schwankungen in seiner Beschaffenheit. Alle Versuche wurden daher mit der gleichen Charge durchgeführt. Serum beeinflusst auch stark die Fähigkeit der Zellen, sich anzuheften. Ist es im Lauf der Kultivierung nötig, um die Zellen effektiv am Leben zu halten, so kann es zu Beginn die Anheftung an Oberflächen erschweren. Daher wurde die Isolation und die ersten Tage in Kultur unter 5% Serumzugabe durchgeführt und erst nach dem ersten Mediumwechsel auf 10% bzw. 20% Serum erhöht. Da es kein speziell für Fische konzipiertes Zellkulturmedium gibt, wurden 4 kommerzielle Medien getestet (MEM Minimal Medium, DMEM, ADF12 und L15). Zusammengefasst: 4 verschiedene Medien, 3 Beschichtungen und zwei Serumkonzentrationen wurden für 5 Gewebe getestet, die entweder als Explantate, oder isoliert aufgetragen werden sollten. Nach der Durchführung dieses Ansatzes wurden folgende Zwischenergebnisse erfasst (Tabelle 1):

Tabelle 1: Übersicht der Zellarten und der bevorzugten Kultivierungsbedingung

Gewebe	Beschichtung	Medium	Serum Konzentration
Gehirn (Vereinzelt)	keine	ADF12	20%
Haut (Explantat)	S- Gelatine	DMEM	10%
Kieme (Explantat)	Fibrigel	DMEM	10%
Leber (Vereinzelt)	S-Gelatine	DMEM	10%
Kopfnieren (Vereinzelt)	S-Gelatine	ADF12	10%

Wobei für Aussage für Kiemen nicht eindeutig ausfallen kann, da das erschwerte Handling durch die 3D-Fibringelbeschichtung zu hohen Abweichungen geführt hat. Auch konnten keine Kiemenzellen erfolgreich über mehrere Passagen kultiviert werden. Kiemenzellen wurden im weiteren Verlauf des Projektes daher nicht mehr betrachtet. Von den übrigen Zellarten konnten erfolgreich mehrere Langzeitkulturen gewonnen und für spätere Versuche eingefroren werden. In Hinblick auf spätere Probennahmen, die im laufenden Schlachtprozess genommen werden sollten, wurde auch davon abgesehen Gehirnzellen weiter zu testen, da die Möglichkeit der Organentnahme vor Ort als zu ungewiss eingestuft wurde.

Die meisten Zuchtachse haben den gleichen genetische Hintergrund. Für die Vorversuche der Isolations- und Kulturoptimierung wurden Wildlachse verwendet, die sich genetisch stark von den Zuchtachsen unterscheiden. Um die Zellkulturen möglich vergleichbar zu den späteren Feldversuchen zu halten, wurden erneut Haut-, Kopfnieren-, Kiemen- und Leberzellen mit den erarbeiteten Methoden isoliert und kultiviert. Es konnte auf Tiere des BioFiA-Versuches zurückgegriffen werden, da diese genetisch den meistgenutzten Zuchtachsen entsprachen. Leber- Haut- und Kopfnierenzellen konnten erfolgreich zu einer hohen Passagennummer gezogen und eingefroren werden. Die Zellen der Zuchtachse zeichneten sich dabei im Vergleich zum Wildlachs durch deutlich schnelleres und robusteres Wachstum aus. Für die Kiemenzellen konnte aber auch hier nicht der Erfolg einer stabilen Zelllinie erzielt werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Fokus im Schwesterprojekt BioFiA komplett auf die Auswertung von Algen im Futtermittel verschoben und eine Stressauslenkung war nicht mehr geplant. Dadurch sind die Überschneidungen weiter verringert worden und der dritten Futtermittelversuch im Projekt BioFiA wurde nicht mehr begleitet.

Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Die Temperatur ist für Fische und Zellen gleichermaßen überlebenswichtig. Temperaturschwankungen bei Aufzucht und im Schlachtprozess von Lachsen ist ein

bedeutender Stressfaktor und sollte daher betrachtet werden und Teil des Auslenkungsversuchs im Projekt BioFiA sein. Einhergehend mit erhöhten Temperaturen ist auch häufig ein Sauerstoffmangel, da warmes Wasser schlechter Sauerstoff aufnehmen und speichern kann als kaltes. Die zwei Stressoren waren daher der Hauptfokus im Projekt. Da der Auslenkungsversuch in BioFiA nicht im ursprünglichen Maße stattfinden konnte, standen zum Zeitpunkt als die Zellkulturen etabliert waren noch keine projekteigenen Analysen zur Verfügung, aber konnte auf eine aktuelle Veröffentlichung zurückgegriffen werden. Im April 2021 wurde "The transcriptomic responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to high temperature stress alone, and in combination with moderate hypoxia" von Beemelmans et.al veröffentlicht. Dort wurde in einer großen Kohorte von Atlantischen Lachsen das mRNA Transkriptom analysiert. Von mRNAs kann man auf den ist-Zustand der Zellen schließen, da mRNAs die Vorstufe zu akut benötigten Proteinen darstellen und dann innerhalb weniger Minuten wieder abgebaut werden.

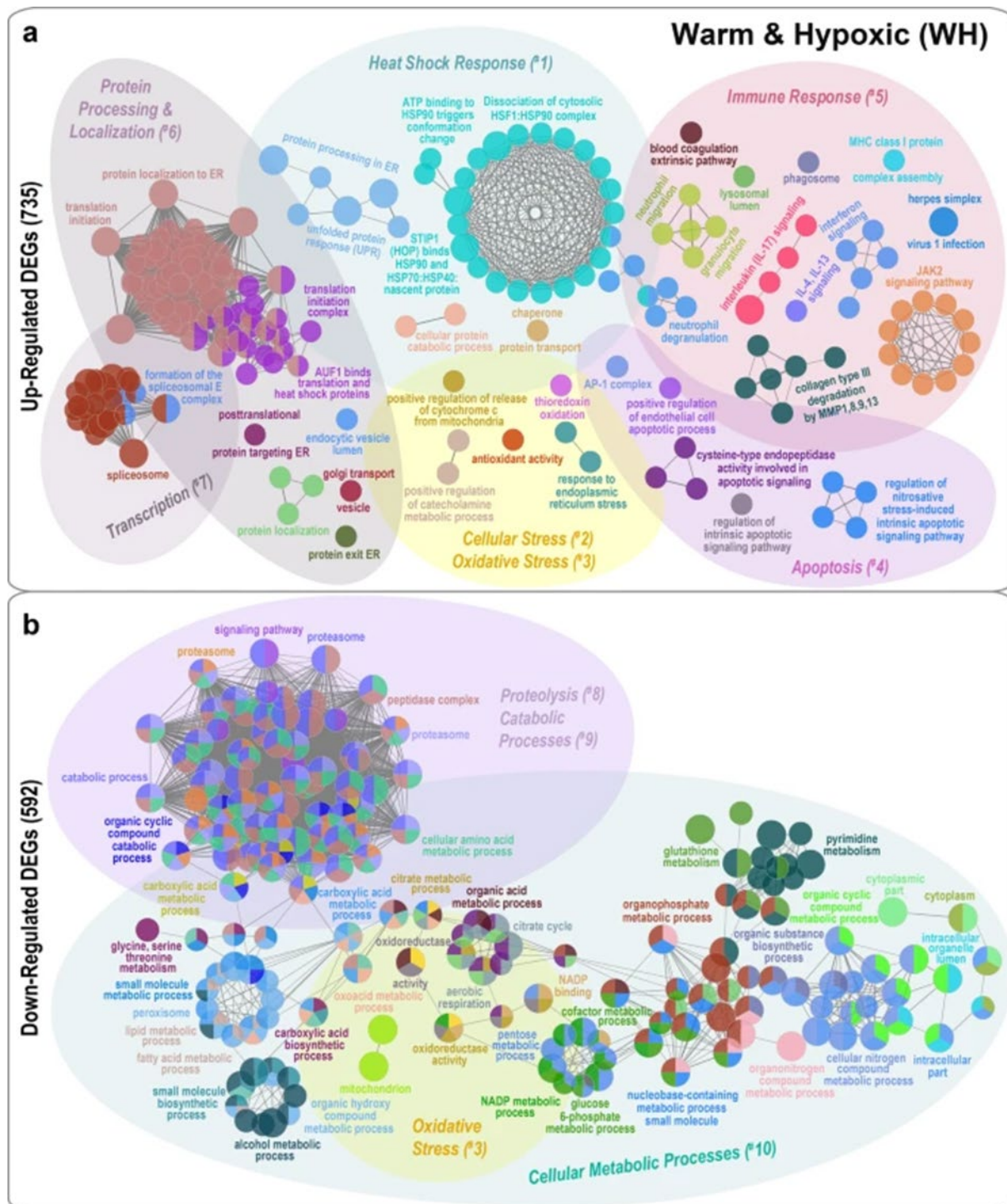


Abbildung 4: Übersicht der hoch- und runterregulierten Prozesse unter Wärme und Sauerstoffstress. Aus Beemelmans et al. 2021, BCM-Genomics

In der Studie wurden Zuchtlachse verwendet und die Lebern der Tiere analysiert. Unter Stress wurden dabei Transkripte bestimmter Prozesse (z.B. Hitze-Schock Reaktion, Zellstress) hoch und anderer Prozesse (z.B. Zellmetabolismus) herunter geregelt (Abb. 4). Aus der Studie wurden die mRNA-Marker ausgewählt, die unter Wärme- und Sauerstoffstress den größten Ausschlag zeigten und entsprechende Primer für die Zellen designt. Um entsprechende Biologische Marker auch in der Zellkultur nachweisen zu können wurde ebenfalls Leberzellen von Zuchtlachsen genutzt. Sie wurden kultiviert und die mRNA der unbehandelten Zellen

isoliert, um das Vorhandensein der ausgewählten Transkripte zu untersuchen. Von ursprünglich 25 getesteten Primern wurden insgesamt 10 Primer in die Engere Auswahl aufgenommen, die stabil in der Zellkultur nachgewiesen wurden konnten. Mit der gleichzeitigen Analyse mehrerer Gene, die unter Stress entweder herunter oder hoch geregelt werden, sollte später eine möglichst eindeutige und stabile Aussage über den Stresszustand gegeben sein.

Das Hauptanliegen einer schnellen und wenig Stress verursachenden Probennahme war mit einer Beprobung der Leber nur *postmortal* umzusetzen, daher wurden auch Hautzellen und Schleimabstriche auf das Vorhandensein der Stressmarker getestet. Mit positiven Ergebnissen. Da Schleim und abgestoßene Hautschuppen permanent vom Fisch an sein Umgebungswasser abgegeben wird, wurde eine Fraunhofer-EMB (jetzt Fraunhofer IMTE) Paten reaktiviert, bei dem RNA aus Haltungswasser isoliert wird. Durch Zusatz von Guanidinium-hydrochlorid wird die RNA in einer Wasserprobe stabilisiert und kann dann, wie aus Zellen isoliert werden. Durch die freie biologische Umgebung mit sehr vielen RNAsen baut sich die freie RNA jedoch noch schneller ab und es ist von sehr geringen Konzentrationen auszugehen. Mit dem patentierten Verfahren wurden Wasser- und Schleimproben von Salmoniden genommen, die am Fraunhofer IMTE gehalten werden. Fünf Stress Gene konnten eindeutig nachgewiesen werden. Die Expression schwanke jedoch stark und zeigte oft Nebenprodukte, die bei spezifischen Primer Paaren nicht auftauchen sollten. Um zu klären, ob die entworfenen Primer tatsächlich Artspezifisch sind, wurden sie für die Primer Sequenzierung eingeschickt. Die Ergebnisse wurden mit den veröffentlichten Genomsequenzen des Atlantischen Lachses abgeglichen und zeigten eindeutige Übereinstimmung. Damit sind die ausgewählten mRNA-Marker auf ihre Spezifität überprüft und ebenfalls für zukünftige Projekte von hohem Wert.

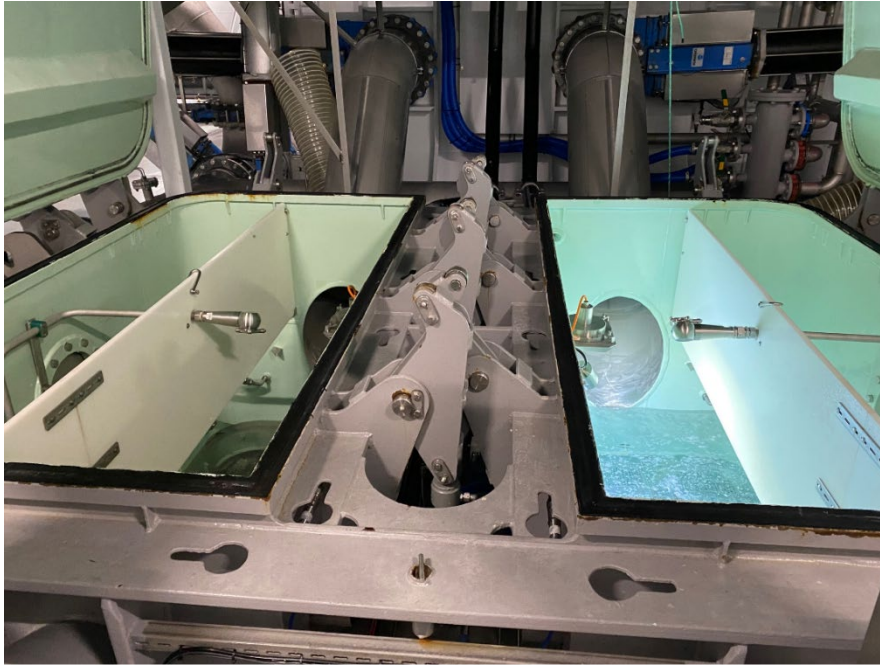


Abbildung 5: Transporttanks an Bord des Transport/Wellboots.

Die Probennahme im laufenden Schlachtbetrieb stellte weiterhin eine Herausforderung dar. Mit der Möglichkeit auf Organproben zu verzichten und auf Fischnahe Wasserproben zu setzen erleichterte die Umsetzung. Im Dezember 2022 konnte die erste Beprobung beim einem norwegischen Lachsproduzenten durchgeführt werden. Es wurden markante Stationen für den Vergleich gewählt. Transportwasser nach einer mehrstündigen Fahrt im Transportschiff (Abb. 5) und am Ausgang der Fischpumpe (Abb. 6).



Abbildung 6: Pumpen der Fisch aus dem Wellboot heraus in den "Waiting Cage" vor der Fabrik.

Es wurden ebenfalls Proben aus den Haltungsnetzen im Fjord genommen, direkt nach Ankunft der Tiere (Abb.6) und vor Beginn des Pumpvorgangs zur Weiterverarbeitung, wenn die Tiere im Netz verdichtet werden (Crowding) (Abb. 7).



Abbildung 7: Crowding. Die Fische werden mit Netzen verdichtet, um für den Weitertransport gepumpt zu werden.

Die abschließende Probe wurde nach dem letzten Pumpvorgang in der Betäubungs- und Tötungsmaschine vorgenommen (Abb. 8), wo die Tiere stark verdichtet, aber immer noch im Wasser vorhanden sind.

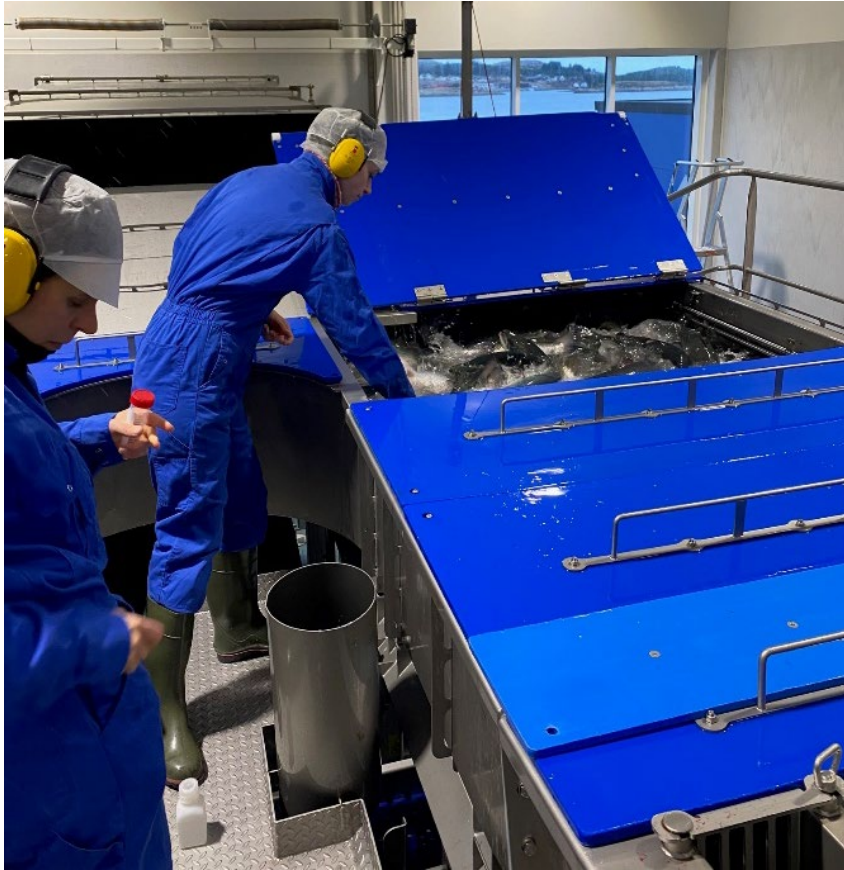


Abbildung 8: Finale Probennahme vor der Schlachtung. Nach Verdichtung im Netz und Pumpen sollte hier der Stress am höchsten sein.

Zwischen diesen Proben sollte ein Unterschied in der Expression der Stressmarker Genen gefunden werden. In den späteren Messergebnissen konnten diese Unterschiede leider nicht festgestellt werden. Die RNA-Konzentration in den Wasserproben war zu niedrig, um eindeutige Aussagen treffen zu können. Dass die Fjord-Proben durch den starken Wasseraustausch eine sehr geringe Konzentration aufzeigen würden, war zu erwarten und war auch als Ausgangssituation mit eingeplant. Die niedrigen mRNA-Konzentrationen kurz vor der Schlachtung dagegen könnten auf eine nicht gewährleistete permanente Kühlung der Proben zurückzuführen sein. Idealerweise werden die Wasserproben direkt nach Gewinnung auf Trockeneis gelagert und bis zur Analyse eingefroren. Aufgrund der Transportwege war diese dauerhafte Kühlung nicht gewährleistet und es kann zu einer Degradation der vorhandenen mRNA gekommen sein. Trotz dieses Rückschlags für den messbaren Stress, hat die vor Ort Besichtigung und die Möglichkeit die hochmodernen Fischtransport- und Verarbeitungsanlagen zu besichtigen einen enormen Kenntniszuwachs gebracht und die Einschätzung für die stresshaften Abschnitte bei der Lachsverarbeitung grundlegend erweitert.

Kundenauswahl: Die Zucht von Lachsen ist in verschiedenen Regionen der Welt möglich, insbesondere in Gebieten mit geeigneten natürlichen Bedingungen oder in kontrollierten Umgebungen wie Aquakulturen. Einige Länder, die für die Lachszucht bekannt sind, sind Norwegen, Chile, Schottland, Kanada, Neuseeland und einige Bundesstaaten der USA wie Alaska. Diese Orte verfügen über geeignete Gewässer, Infrastruktur und Technologien, um eine erfolgreiche Lachszucht zu betreiben.

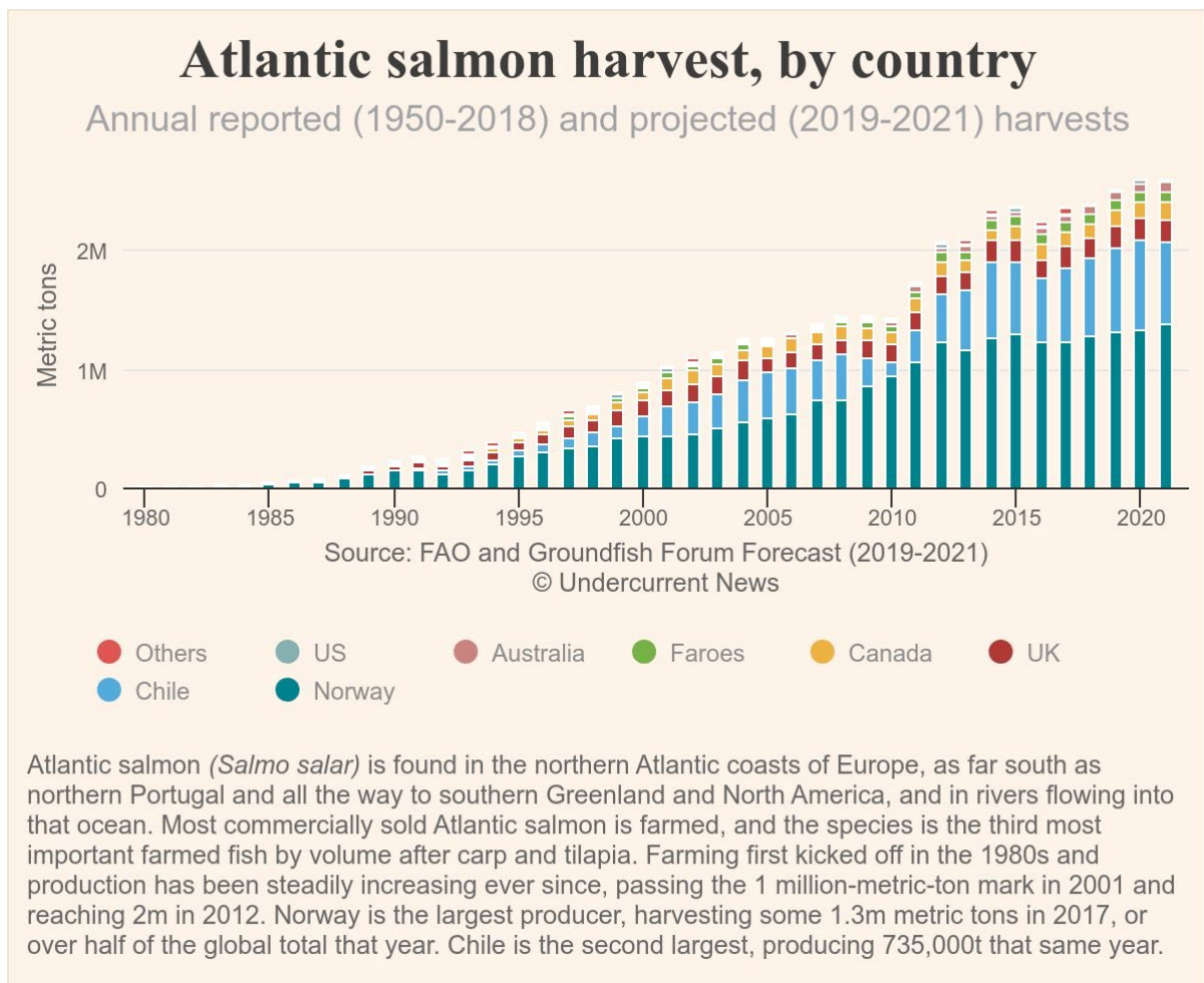


Abbildung 9: Übersicht der weltweiten Lachsproduktion. Norwegen ist der größte Lachsproduzent weltweit. Aus <https://www.undercurrentnews.com/data/supply-and-quotas/#jqz7zu1>

Die norwegische Lachsindustrie spielt eine entscheidende Rolle in der globalen Fischerei- und Lebensmittelwirtschaft. Norwegischer Lachs ist weltweit bekannt für seine Qualität, Frische und Nachhaltigkeit, was ihn zu einem begehrten Produkt auf internationalen Märkten macht. Diese Branche ist nicht nur für die norwegische Wirtschaft von großer Bedeutung, sondern auch für die Sicherstellung einer stabilen und gesunden Nahrungsversorgung weltweit.

Norwegen ist einer der größten Produzenten von Zuchtlachs weltweit (Abb. 6). Mit seinen fjordreichen Küsten und klaren Gewässern bietet das Land optimale Bedingungen für die Aufzucht von Lachsen. Die norwegische Lachsindustrie hat in den letzten Jahrzehnten ein

enormes Wachstum erlebt und sich zu einem wichtigen Exporteur entwickelt. Die Nachfrage nach norwegischem Lachs steigt stetig, da Verbraucher weltweit die hochwertigen Produkte schätzen, die unter strengen Qualitätsstandards produziert werden.

In Bezug auf die Zuchtlachsproduktion weltweit betrug sie im Jahr 2021 etwa 1,4 Millionen Tonnen. Norwegen war dabei einer der führenden Produzenten und trug einen beträchtlichen Teil zu dieser Gesamtmenge bei. Die Zuchtlachsindustrie hat sich zu einem wichtigen Wirtschaftszweig in vielen Ländern entwickelt und spielt eine entscheidende Rolle bei der Versorgung der wachsenden Weltbevölkerung mit hochwertigem Protein.

Die Bedeutung der norwegischen Lachsindustrie erstreckt sich jedoch über wirtschaftliche Aspekte hinaus. Sie ist auch ein Vorreiter in Bezug auf nachhaltige Praktiken und Umweltschutzstandards. Norwegischer Zuchtlachs wird unter strengen Auflagen bezüglich Umweltverträglichkeit und Fischereimanagement produziert, um die langfristige Gesundheit der Meeresumwelt und der Fischbestände zu gewährleisten. Dieses Engagement für Nachhaltigkeit ist ein wichtiger Faktor, der das Vertrauen der Verbraucher in norwegischen Lachs stärkt und seine Attraktivität auf dem globalen Markt steigert.

Insgesamt ist die norwegische Lachsindustrie ein herausragendes Beispiel für erfolgreiche Fischerei- und Aquakulturpraktiken. Ihr Einfluss erstreckt sich über die Grenzen Norwegens hinaus und prägt die globale Lebensmittelversorgung und -wirtschaft maßgeblich.

Inmitten der globalen Herausforderungen der Corona-Pandemie unternahmen wir intensive Bemühungen, um Industrieproduktionsstätten zu besichtigen. Unser Ziel war es, Einblicke in verschiedene Betriebe zu erhalten, die sich durch ihre innovative Herangehensweise und ihre Nachhaltigkeitspraktiken auszeichnen. Trotz unserer engagierten Anstrengungen stießen wir auf zahlreiche Hindernisse, die auf die Pandemiebestimmungen und Vorsichtsmaßnahmen zurückzuführen waren.

Wir unternahmen mehrere Anläufe, um Unternehmen in verschiedenen Regionen zu besichtigen, darunter ein Unternehmen auf den Färöer-Inseln, das sich durch seine ganzheitliche Wertschöpfungskette auszeichnete. Ebenso versuchten wir, ein Unternehmen in Schottland zu besuchen, das eine lange Lebensdauer seiner Pumpenstrecke aufwies. Des Weiteren planten wir Besuche bei mehreren Unternehmen in Norwegen, die für ihre herausragenden Leistungen in verschiedenen Industriezweigen bekannt waren.

Jedoch wurden unsere Bemühungen immer wieder durch die geltenden Pandemiebestimmungen und die Vorsichtsmaßnahmen der Betriebe vereitelt. Die Besichtigungen konnten aufgrund der strengen Regeln und Beschränkungen nicht stattfinden. Diese Situation führte zu einer langen Zeit der Frustration und Enttäuschung, da wir unsere aufwendig geplanten Besuche nicht realisieren konnten.

Trotz der zahlreichen Rückschläge konnten wir letztendlich einen Besuch bei einem der neuesten und modernsten Lachsproduktionsverarbeiter in Norwegen arrangieren. Dieses

Unternehmen zeichnete sich durch seine innovativen Ansätze und seine Nachhaltigkeitspraktiken aus. Der Besuch bot uns wertvolle Einblicke in die Prozesse und Technologien, die zur Herstellung hochwertiger Produkte unter Berücksichtigung ökologischer und sozialer Aspekte eingesetzt werden.

Insgesamt war es eine herausfordernde Zeit, Industrieproduktionsstätten zu besichtigen, während die Welt von der Corona-Pandemie betroffen war. Trotz der Schwierigkeiten konnten wir zumindest einen Besuch erfolgreich durchführen und wertvolle Erkenntnisse gewinnen.

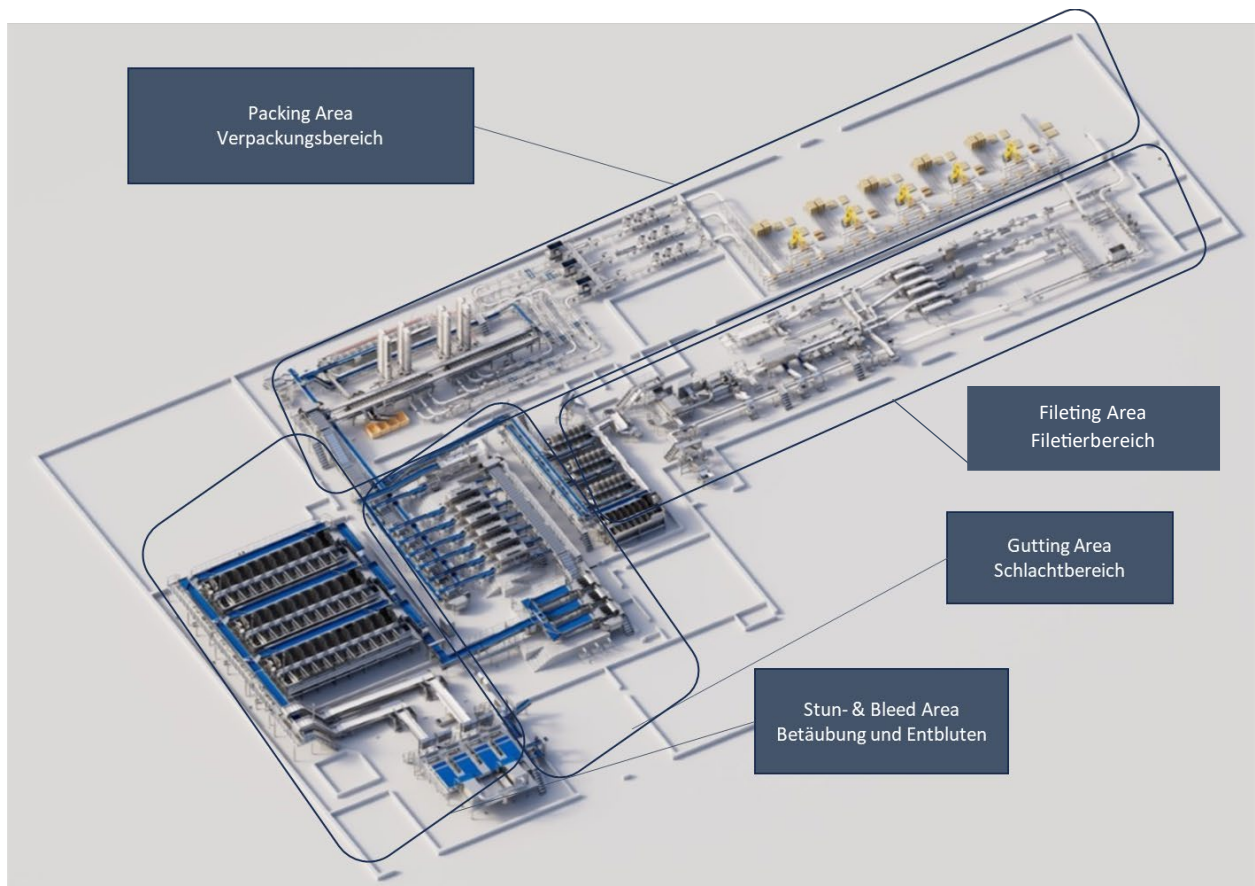


Abbildung 10: Aufbau der besuchten Lachsverarbeitungsanlage in Norwegen. Von Nordischer Maschinenbau Rud.BAADER GmbH & Co. KG

Die Grafik zeigt das Layout der besuchten Anlage in Norwegen. Zu sehen sind hier vier wesentliche Bereiche. In der Betäubungs- und Ausblute-Zone werden die Fische lebendig in das System gepumpt. Dieser Bereich bietet einen optimalen Ort für Stressmessungen, da sowohl die Pumpstrecke selbst als auch die Zusammenführung der Netze sehr stressig für die Fische sein können. Nach der Betäubung werden hier die Fische erstmalig vereinzelt.

Im Schlachtbereich ist es entscheidend, dass die Fische noch nicht in die Leichenstarre übergegangen sind, da dies eine automatisierte Schlachtung nahezu unmöglich macht. In diesem Schritt werden erste Qualitätsdaten erfasst, insbesondere durch Fotos, die den

Innenraum der Fische zeigen. Diese Bilder können Hinweise auf Blutflecken im Filet liefern, die durch Stress verursacht werden können.

Direkt im Anschluss wird entschieden, wie der Fisch weiterverarbeitet wird. Nur perfekte Fische dürfen für den Verpackungsprozess ausgewählt und exportiert werden. Alle anderen Fische müssen in Norwegen verbleiben und dort verarbeitet werden. Daher werden Fische von geringerer Qualität entweder anders verpackt, weiterverarbeitet oder eingelagert.

Im Filetierbereich treten die meisten Qualitätsmängel auf, die auf Stress zurückzuführen sind. Ein häufiges Problem ist das sogenannte "Gaping", das durch Löcher im Filet dargestellt wird. Eine mögliche Farbveränderung im Filet kann auf Stress in der Aufzucht oder nicht ideale Futterkomposition hinweisen. Darüber hinaus werden in diesem Bereich weitere Einblutungen und Pigmentstörungen im Filet sichtbar. Ein weiteres Qualitätsmanko, das ebenfalls auf Stress zurückzuführen sein können.

Während unseres Besuchs konnten wir die erweiterte Wertschöpfungskette kennenlernen, die unter anderem die sogenannten "Waiting Cages" umfasst. Dabei handelt es sich um Fischbecken vor dem Firmengelände, in denen die Fische von den Farmen angeliefert werden. In diesen Cages werden die Tiere gehalten, bis sie anschließend lebend in die Fabrik gepumpt und geschlachtet werden. Darüber hinaus hatten wir die Gelegenheit, ein "Wellboat" zu besichtigen und dort Proben zu nehmen. Wellboote sind Schiffe, die die Fische von den Zuchtfarmen zur Fabrik transportieren. Sie sind mit einer Vielzahl an Überwachungssystemen ausgestattet, die einen möglichst schonenden Transport der Tiere ermöglichen sollen.

Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse nach Nr. 5 der NABF

Es sind keine wissenschaftlichen Veröffentlichungen geplant. Das Wissen, gerade im Bereich der aquatischen Zellkultur über optimalen Isolations- und Kulturbedingungen von verschiedenen Lachszellen hat enorm zugenommen. Die ausgetesteten Medienkompositionen werden auch für die Durchführung zukünftiger Projekte genutzt werden können. Ebenso wie die identifizierten und evaluierten Stress-Gene, aber die Datenlage ist für eine Veröffentlichung zu einseitig. Ohne die Ausnahmesituation der Pandemie und der damit einhergehenden Reise- und Besuchsbeschränkungen wäre in diesem Projekt ein Vielfaches an Feldversuchen und Testungen möglich gewesen. Trotzdem ist der Erkenntnisgewinn und die Einblicke, die Fraunhofer IMTE im Bereich der industriellen Lachsverarbeitung gewinnen konnte unbezahlbar und war nur in Zusammenarbeit mit der Firma BAADER und deren aufgeschlossenen Kunden möglich. Das gemeinsame Projekt SensoFiA hat so den Grundstein für weitere Projekte zwischen Fraunhofer IMTE und BAADER gelegt.