



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 37 740 A1** 2004.03.11

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **102 37 740.5**

(22) Anmeldetag: **17.08.2002**

(43) Offenlegungstag: **11.03.2004**

(51) Int Cl.7: **A01N 65/00**

(71) Anmelder:  
**Heidrich, Stefan, 04277 Leipzig, DE**

(72) Erfinder:  
**gleich Anmelder**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Verwendung natürlicher und synthetischer Huminstoffe in Fischzucht und -haltung**

(57) Zusammenfassung: Das Mittel zur Anwendung in der Fischzucht- und -haltung eignet sich zur Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen von Fischen in der Aquakultur, Aquaristik sowie in Zier- und Gartenteichen. Die zugehörigen Anwendungsformen sind der Zusatz zum Wasser und Futter. Der Zusatz zum Futter erhöht außerdem die Futter- und Kotstabilität und reduziert in den Fischhaltungsanlagen bzw. Aquarien und Teichen die Wassertrübung sowie eine Belagbildung.

Der Zusatz des erfindungsgemäßen Mittels zum Wasser vermindert allein und insbesondere in Kombination mit Wasserstoffperoxid Ei-/Laichverpilzungen.

Als erfindungsgemäßes Mittel dient natürlicher Braunkohlehuminstoff oder synthetischer Huminstoff in fester Form oder in Wasser gelöst.

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Anwendung in der Fischzucht und in der Fischhaltung, speziell für den prophylaktischen und therapeutischen Einsatz bei multifaktoriell erkrankten und gestressten Fischen. Sie betrifft ferner den Einsatz eines Mittels als Futterzusatz zur

- a) Steigerung des Ertrages in der Fischzucht
- b) Hemmung des Algen- bzw. Belagwachstums und Wasserklärung

[0002] und schließlich dessen Einsatz zur antimykotischen Behandlung von Fischlaich.

## Stand der Technik

[0003] Es ist bereits bekannt, in der Fischzucht Huminstoffe einzusetzen. Huminstoffe sind braungefärbte, höher- bis hochmolekulare Verbindungen, die sich aus chemisch unterscheidbaren Fraktionen zusammensetzen. Sie sind typische Bestandteile von Böden, sozusagen Naturstoffe, und finden sich beispielsweise in Braunkohlen und Torfen. Synthetisch können aber auch niedermolekulare Huminstoffe aus autoxidierendem Hydrochinon hergestellt werden (EP-B 0281678 v. 10.2.1987 u. EP 0537427 A1 v. 31.7.1992). Nach den Besonderheiten ihrer Genese kann bei den Naturstoffen keine chemische Konstitution im Sinne der niedermolekularen Chemie erkannt werden (ZIECHMANN 1996). Es existieren eine Reihe von Nahrungsmodellen, wie die Strukturvorschläge von KLEINHEMPEL (1970) und KICKUTH (1972). Danach sind Huminsäuren, die Hauptfraktion der natürlichen Huminstoffe, dreidimensionale Makromoleküle mit Molmassen zwischen etwa 1000 bis 200000 und heterogen verknüpften Bausteinen.

[0004] Die Bezeichnung Huminstoffe beschreibt drei Gruppen: Fulvosäuren, Huminsäuren und Humin. Diese Unterscheidung beruht auf der traditionellen Fraktionierung von Bodenhuminstoffen. Durch die Behandlung des gesamten Huminstoffmaterials mit verdünnten Basen werden die löslichen Fulvo- und Huminsäuren von den unlöslichen Humine herausgelöst. Nach der Ansäuerung des alkalischen Extraktes fallen die Huminsäuren aus (STEVENSON 1982 u. 1994).

[0005] Die medizinischen Wirkungen von Huminstoffen werden in erster Linie bei balneotherapeutischen Heilverfahren genutzt (ZIECHMANN 1996, S. 14-18). Auch in der Veterinärmedizin bestehen Erfahrungen mit Huminsäuren aus Braunkohlehuminstoffen bei Groß- und Kleintieren im Einsatz bei Erkrankungen der Verdauungsorgane in Verbindung mit Störungen des Verdauungsstoffwechsels (KÜHNERT et. al. 1989).

[0006] BÜRGI-STÖCKLIN (1996) erläutert die Anwendung von Huminsäure innerhalb eines kombinierten Einsatzes probiotischer Wachstumsförderer für Schweine. Die einzelnen bekannten Huminsäure-Wirkungen sollen zur Erhaltung einer gesunden Darmflora beitragen, eine gute Futterverwertung ermöglichen und damit eine Alternative zu den herkömmlichen Fütterungsantibiotika darstellen.

[0007] Einen ergotropen Effekt durch den Einsatz von Huminsäure in der Schweinemast beschreiben DUNKEL (1996), DUNKEL und WALLMEYER (1999) und DUNKEL (2001). Sie weisen auf zunehmende Einschränkungen von antimikrobiellen Leistungsförderern durch die EU-Gesetzgebung hin. Deshalb werden eine Reihe von Stoffen durch neue Technologien auf die Optimierung spezifischer Organfunktionen oder bestimmter Körperfunktionen hin verändert und angewendet. Diese als Nutrizeutika bezeichneten Stoffe sind in der Lage, dosisabhängig krankheitsprophylaktische oder therapeutische Funktionen zu erfüllen und durchaus mit antimikrobiell wirksamen Leistungsförderern konkurrieren. Einen der markantesten Vertreter stellen den Autoren zufolge die Huminsäuren mit ihrer spezifischen Wirkungen auf das Magen-Darm-System dar. Besonders wird der ergotropen Effekt auf den im Wachstum befindlichen Organismus hervorgehoben. Es wurden vier Fütterungsversuche in der Aufzucht von Ferkeln mit jeweils einer Versuchsgruppe (N = 640) und einer Kontrollgruppe (N = 250/260) durchgeführt. Der erste Versuch begann aufgrund von Erkrankungen mit einer 14-tägigen Gabe von 0,5 kg Colistinsulfat/t Futter. Danach wurde der Einfluss einer Zumischung von Cellu-Ligno-Karbon-Isolat (CLK) zum Futter überprüft. Der Anteil von CLK betrug im ersten Versuch 7,5 kg, in den folgenden 5,0 kg/t Futter. Im Fütterungsversuch mit 7,5 kg CLK/t Futter konnte in der Versuchsgruppe insgesamt ein besseres Aufzuchtergebnis als in der Kontrollgruppe erreicht werden. In der Versuchsgruppe reduzierte sich die Anzahl der Masttage von 146 auf 138 und der mittlere Futterverbrauch von 249,1 auf 227,7 kg/Tier. Auch das mittlere Ausschlacht-Endgewicht lag mit 97,1 kg höher als mit 94,8 kg in der Kontrollgruppe. Die Verlustrate und der Magerfleisch-Anteil waren geringfügig niedriger. Der Autor beurteilt abschließend die Anwendung der Huminsäure in der Schweinemast im Vergleich zu den klassischen Antibiotika/Chemotherapeutika-Leistungsförderern als ebenbürtig. Im Ergebnis eines weiteren Versuches bei der Zumischung mit 5 kg CLK/t Futter verringerten sich zwar gleichfalls die Masttage der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe um 8 Tage, lagen jedoch um 4 Tage höher als bei der höheren Zumischung von 7,5 kg CLK/t Futter im ersten Versuch. Wiederum reduzierte sich in der Versuchsgruppe der mittlere Futterverbrauch von 269,2 auf 240,3 kg/Tier. Gleichfalls lag das mittlere Ausschlacht-Endgewicht mit 97,9 kg höher als mit 96,1 kg in der Kontrollgruppe. Wie im vorigen Versuch verlief die gesamte Mast ohne nennenswerte Störungen und Erkrankungen. In einem Versuch mit Fusariento-

xin-belasteten Weizen in der Ration kam es in der Kontrollgruppe zu erheblichen Störungen bei der Futteraufnahme. In gleichartigen Futtern konnten erhöhte Gehalte an Deoxynivalenol (DON) mit 15,0 mg/kg und Zearalenol (ZEA) mit 3,4 mg/kg nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe wurde ein Auseinanderwachsen und ein gehäuftes Auftreten von Kämmerern festgestellt. In der Versuchsgruppe verlief zwar die Aufnahme des belasteten Futters ohne sichtbare Störungen, die Gewichtsentwicklung war jedoch weniger einheitlich als in den beiden vorangegangenen Versuchen. So verringerte sich die Mastdauer gegenüber der Kontrollgruppe um 14 Tage, lag aber nochmals 9 Tage höher als im vorhergehenden Versuch mit der Zumischung mit 5 kg CLK/t Futter. Die Futtereinsparungen kamen mit einem Futterverbrauch von 241,0 kg in der Versuchsgruppe und 266,2 kg in der Kontrollgruppe dem zweiten Versuch nahe. Auch das Ausschlacht-Endgewicht konnte mit 97,3 kg in der Versuchsgruppe und 95,5 kg in der Kontrollgruppe wiederum um 1,8 kg gesteigert werden. Ebenso lagen in beiden Folgeversuchen die Verlustrate und der Magerfleisch-Anteil geringfügig niedriger. Im vierten Versuch bestätigen sich die Ergebnisse mit einer um 8 Tage verringerten Mastzeit, einem um 25,2 kg niedrigeren Futterverbrauch und einer um 1,8 kg höheren Gewichtszunahme. Die Autoren verdeutlichen durch eine Kosten-Nutzen-Gegenüberstellung die erhebliche wirtschaftliche und tiergesundheitliche Bedeutung des Einsatzes von Huminsäuren. Zusammenfassend wird festgestellt, dass mit dem Einsatz von Huminsäure in belastetem und unbelastetem Futter am gesunden sowie kranken Tier gute Leistungssteigerungen erzielt werden.

[0008] Es ist weiterhin bekannt, dass Torfe und Torfextrakte im weiteren Sinne seit Jahrzehnten, neuerdings auch andere Extrakte (Eiche), in der Aquaristik zur biologischen Verbesserung der Wassereigenschaften und zur Erzielung eines besonderen Milieus eingesetzt werden. Dies geschieht in Form der Präparate Torumin® (TETRA WERKE) und Morena® (SERA WERKE HEIMTIERBEDARF), die Zusätze von Torfextrakten enthalten, dem Hälterungswasser zugesetzt werden und Anwendung bei der Haltung von Schwarzwasserfischen finden.

[0009] Desweiteren sind mehrere Produkte auf Torfbasis zur Anwendung in Gartenteichen auf dem Markt, die auf Grund einer pH-Wert-Absenkung und dem lichtdämpfenden Effekt durch die Einfärbung und -trübung des Wassers insbesondere zur Verminderung einer übermäßigen Algenentwicklung bestimmt sind. Es fehlen jedoch wissenschaftliche Angaben zur möglichen Wirkung und deren Erklärung. Der Einsatz ist allein auf Wasserpflagemittel begrenzt.

[0010] In der Europäischen Union ist die derzeitige Situation in der Medikamentierung von Fischkrankheiten durch einen umfassenden Therapienotstand gekennzeichnet. Der Einsatz und die Resistenzsituation bei den verschiedenen antimikrobiell wirkenden Arzneimitteln veranlasst zu einer kritischen Auseinandersetzung mit der geltenden Praxis.

[0011] Beim Auftreten von Fischkrankheiten spielt ein frühzeitiges Eingreifen mit vorwiegend prophylaktischem Charakter sowie ein Vermeiden und Mildern von krankheitsauslösenden Faktoren eine immer größere Rolle. Aus diesem Grund kommt der Suche nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten eine hervorragende Bedeutung zu.

[0012] In der Aquaristik und bei auf einen hohen Schauwert abzielenden Garten- und Zierteichen besteht dringender Bedarf an einem Mittel zur prophylaktisch Algenhemmung, das ohne toxische Wirkungen auf Fisch und Umwelt seine Wirkung bedarfsgerecht entfaltet.

[0013] Die teilweise in der Aquaristik und im Gartenteichbereich verwendeten Präparate mit Zusätzen natürlicher Huminstoffe in Form von naturbelassenem Torf und Extrakten, z. B. aus Torf und Eiche, unterliegen je nach Herkunft und Aufbereitung starken Schwankungen in Gehalt und Zusammensetzung. Sie werden nur als Wasserpflagemittel, so zur Erzeugung eines besonderen Milieus beispielsweise für südamerikanische Salmmler oder durch die sich ergebene Wassereinfärbung und -trübung mit nachfolgender Dämpfung des Lichteinfalls zur Hemmung des Algenwachses in Gartenteichen, empfohlen. Eindeutige wissenschaftliche Erklärungen zu Wirkung und Wirksamkeit fehlen bisher.

[0014] Die Anwendung und Überprüfung von Huminstoffen in der Nutzfischzucht ist bisher wahrscheinlich aus dem Grunde der knappen Preiskalkulation für die Fischzüchter unterblieben. Der Preis der Huminstoffe, die zum Futterzusatz geeignet sind, übersteigt um ein Vielfaches den Futterpreis, dies gilt in besonderem Maße für die synthetischen Huminstoffe. Für die Badebehandlung mit Huminstoffen fehlen Vorgaben und ähnliche Verwendungen in der Medizin, Veterinärmedizin und Landwirtschaft; hier sind keine vergleichbaren Anwendungen und Nutzungen bekannt.

[0015] Für Fische existieren keine Arzneimittel von Huminstoffen. Auch fehlen Futtermittel für Fische mit dem Zusatz von Huminstoffen.

[0016] Die Ursachen für die Nachteile von herkömmlichen Prophylaktika und Therapeutika resultieren aus deren langjährigem ausgedehnten und teilweise unbedachten Einsatz, z. B. von Antibiotika, Chemotherapeutika sowie Triphenylfarbstoffen u. a. Wirkstoffen zur Beseitigung von bakteriellen, parasitären und umweltbedingten Erkrankungen sowie zur Ertragssteigerung. Aus diesem Einsatz entwickelten sich z. T. ungünstige Resistenzsituationen für die Behandlung von Erkrankungen bei Tier und Mensch. Desweiteren ist der Einsatz herkömmlicher Mittel oft mit starken Nebenwirkungen, Risiken und Umweltschädigungen verbunden.

[0017] Ursachen für die hohen Erzeugerpreise von Huminstoffen ergeben sich bei den Braunkohlehuminstoff-

fen in deren Abbau, Aufbereitung und Standardisierung. Die synthetischen Huminstoffen werden mit aufwendigen Produktionsverfahren hergestellt und erreichen so ein sehr hohes Preisniveau.

[0018] Ziel der Erfindung ist es, Einsatzgebiete bei der Vermeidung und Behandlung von Schädigungen an Fischen, die bei Abfischung, Transport und Hälterung entstehen aufzuzeigen, bei der Aufzucht von Fischen sowie bei der Eibehandlung die Ertragslage zu verbessern und einen störungsfreien und ästhetisch ansprechenden Betrieb von Anlagen in der Aquakultur und Aquaristik zu gewährleisten (Verminderung einer Belagbildung).

[0019] Das neue Mittel zur Prophylaxe und Therapie in der Fischzucht wurde entwickelt, da beim Auftreten von Fischkrankheiten ein Eingreifen mit gesundheitlich unbedenklichen Stoffen sowie ein Vermeiden und Milderndem von krankheitsauslösenden Faktoren eine immer größere Rolle spielt.

[0020] Bei der Aufzucht von Fischen sollen verbesserte Wachstumsleistungen und geringere Fischverluste erreicht werden.

[0021] Allen Anwendern in der Aquakultur und Aquaristik, die an einem algen- bzw. bewuchshemmenden Mittel interessiert sind, soll ein sehr gut verträgliches und für die Umwelt unbedenkliches Mittel einmal als Zusatz zum Wasser und weiter als Zusatz zum Futter zur Verfügung gestellt werden. Jede Fütterung ist mit einem Eintrag algenwachstumsfördernder Nährstoffe verbunden. Durch den Zusatz von algenwachstumshemmendem und praktisch untoxischem Huminstoff kann eine bedarfsabhängige Dosierung gewährleistet werden.

[0022] Die Erfindung bezieht sich auf die Anwendung von natürlichem und synthetischem Huminstoff bei Fischen als:

1. Bad von Huminstofflösungen zur Prophylaxe und Therapie von multifaktoriellen Erkrankungen
2. Futterzusatz bis zu einem Anteil von maximal 5% an der Gesamtnahrung zur Ertragssteigerung bei der Aufzucht und Haltung von Fischen sowie zur Reduzierung des Wachstums von Belägen (Bewuchs aus Algen u. a. Mikroorganismen) und zur Wasserklärun
3. Bad von Huminstofflösungen in Kombination mit vorhergehender Wasserstoffperoxid-Behandlung zur Prophylaxe und Behandlung von Eiverpilzungen

#### Chemische Charakterisierung

##### Natürlicher Braunkohle-Huminstoff (Anwendung 1, 2 und 3):

[0023] Pulverisiertes, in Wasser fast unlösliches Natriumhumat-Huminsäuregemisch (mind. 50 % Huminsäuren bezogen auf die TS) mit geringen Anteilen an Carboxymethylcellulose (Hilfsstoff), Alkali- und Erdalkalihumaten und dem Trägerstoff Kohlenstoff. Die wirksame Komponente stellt die Humat-Huminsäure-Fraktion mit dem Ausgangsmaterial Braunkohle dar.

[0024] Als flüssige Variante besitzt die Wirkstofflösung einen Anteil von 10% Na-Humat-Huminsäure.

#### Synthetischer Huminstoff

[0025] Das synthetische niedermolekulare Humat (Syn. Huminat), Natrium- oder Kaliumsalz, ist hergestellt aus autoxidierendem Hydrochinon (EP-B 0281678 v. 10.2.1987 u. EP 0537427 A1 v. 31.7.1992) und leicht löslich in Wasser.

[0026] Im folgenden werden die allgemeine Bezeichnung „natürlicher Braunkohle-Huminstoff“ bzw. „10%ige Huminstoff-Lösung“ und „synthetischer Huminstoff“ verwendet.

#### Ausführungsbeispiel

#### Ausführungsbeispiele

##### 1.1 Badebehandlungen mit Huminsäure bei einjährigen Goldfischen in der teichwirtschaftlichen Hälterung

###### 1.1.1 Versuch I: Tiere, Material und Methoden

###### 1.1.1.1 Tiere

[0027] Es standen zweijährige Goldfische aus der Frühjahrsabfischung einer Teichwirtschaft zur Verfügung. Die Tiere stammten aus derselben Population und waren dem natürlichen Keimdruck der sie umgebenden Umwelt ausgesetzt. In Folge der allgemeinen Schwächung nach der Überwinterung und der üblichen Maßnahmen wie Abfischen, Zählen, Wiegen, Transport und Hälterung wiesen die Fische zunehmend auffällige Krankheitssymptome auf. Nach sechs Tagen ergab die Sektion von fünf Fischen mit einer Körperlänge von 17...21 cm und schlechtem Allgemeinzustand Hautläsionen, Flossenrandnekrosen, Ekchymosen an den Flossen sowie

Randnekrosen, Blutungen und eine vermehrte Schleimbildung an den Kiemen. Auch nach weiteren vier Tagen war das Verlustgeschehen nicht rückläufig. Die Krankheitssymptome verstärkten sich. Fünf untersuchte Fische mit einer Körperlänge von 11...19 cm wiesen hochgradige Flossenrandnekrosen mit Verpilzung und teilweise hochgradige Nekrosen in den Kiemen auf.

#### 1.1.1.2 Versuchsanlage

[0028] Die zur Hälterung sowie Behandlung benutzten GVP-Silos besaßen einen Durchmesser von 153 cm bei einer Höhe von 90 cm. In der Mitte befand sich ein PVC-Rohr als Abfluss, so dass sich ein Wasservolumen von 1,5 m<sup>3</sup> ergab. Das Silo wurde mit einer Mischung aus Teich- und Brunnenwasser, jeweils zur Hälfte, versorgt. Dieses Wasser lief über einen Zylinder. Dieser war gefüllt mit Plastikteilen, die eine große Oberfläche besaßen. Der Zulauf ins Silo erfolgte seitlich der Mitte, so dass eine leichte Strömung erzeugt wurde. Die Wasserzufuhr war kontinuierlich mit einem Durchfluss von 40 l/min gewährleistet. Durch die tägliche Fütterung mit lebenden Wasserflöhen wurde der Erhaltungsbedarf der Fische gedeckt.

#### 1.1.1.3 Testsubstanz

[0029] Es wurde natürlicher Braunkohle-Huminstoff in Form der 10%igen Huminstoff-Lösung als Zusatz zum Fischwasser überprüft.

#### 1.1.1.4 Behandlungsregime

[0030] 10 Tage nach dem Abfischen des erkrankten Fischbestandes wurde der Versuch begonnen.

[0031] Die Badebehandlungen wurden täglich eine Stunde jeweils mittags über einen Zeitraum von vier Tagen durchgeführt. Zur Behandlung wurde der Wasserzufluss jeweils unterbrochen und 100 ml/m<sup>3</sup> der 10%igen Huminstoff-Lösung im Wasser verteilt, so dass sich im Behandlungsbad eine Konzentration von 10 mg/l ergab.

### 1.1.2 Versuch II: Tiere, Material und Methoden

#### 1.1.2.1 Tiere

[0032] Es standen zweijährige Goldfische aus der Frühjahrsabfischung einer Fischzucht zur Verfügung. Die Tiere stammten aus derselben Population und waren dem natürlichen Keimdruck der sie umgebenden Umwelt ausgesetzt.

[0033] Die Goldfische wurden abgefischt, am gleichen Tag transportiert und 700 Stück des Bestandes in einer GVP-Rinne gehältert. Die Fische wiesen Krankheitssymptome wie Körperschräglage, geschwürige und verpilzte Hautveränderungen, Schleimhautabschürfungen, Flossenrandnekrosen, Blutungen an den Flossen und der Haut sowie Kiemenschwellungen bzw. blassrote anämische Kiemen mit punktförmigen Nekrosen auf. Durch die parasitologisch Untersuchung der Fische wurden ein hochgradiger *Trichodina* sp.-Befall und geringgradiger *Ichthyobodo* sp.-Befall der Haut und der Kiemen sowie zusätzlich ein geringgradiger *Gyrodactylus* sp.-Befall der Haut und ein geringgradiger *Dactylogyrus* sp.-Befall in den Kiemen nachgewiesen.

#### 1.1.2.2 Versuchsanlage

[0034] Für die Versuche wurden zwei GVP-Rinnen verwendet. Die Rinnen besaßen eine Länge von 388 cm und eine Breite von 75 cm. Durch ein entsprechend als Überlauf angebrachtes PVC-Rohr ergab sich ein Wasservolumen von jeweils 0,6 m<sup>3</sup> bei einem Wasserstand von 20 cm in der Mitte der Rinnen. Die Rinnen wurden vor dem Besetzen grob gesäubert.

[0035] Zur Wasserversorgung diente Teichwasser aus einem mit K<sub>1</sub> besetzten Aufzuchtteich. Die Wasserzufuhr war kontinuierlich mit einem Durchfluss von 15 l/min gewährleistet. Während der Untersuchungen wurde der Erhaltungsbedarf durch die Fütterung mit Karpfenpelletfutter gedeckt.

#### 1.1.2.3 Testsubstanz (analog Versuch I)

#### 1.1.2.4 Behandlungsregime

[0036] Die Badebehandlungen der Versuchsgruppe wurden täglich mittags mit 100ml/m<sup>3</sup> 10 %ige Huminstoff-Lösung, analog des Versuchs I, durchgeführt. Zur Behandlung wurde der Wasserzufluß unterbunden.

[0037] Die Behandlungsdauer betrug vom ersten bis vierten Tag (erster Versuchsabschnitt) 1,5 h, vom fünften bis achten Tag (zweiter Versuchsabschnitt) 2,0 h und vom neunten bis zwölften Tag (dritter Versuchsabschnitt)

1,5 h. Das Behandlungswasser färbte sich in weniger als einer Stunde nach Wiederherstellung des Wasserzuflusses aus.

### 1.1.3 Versuch I: Ergebnisse

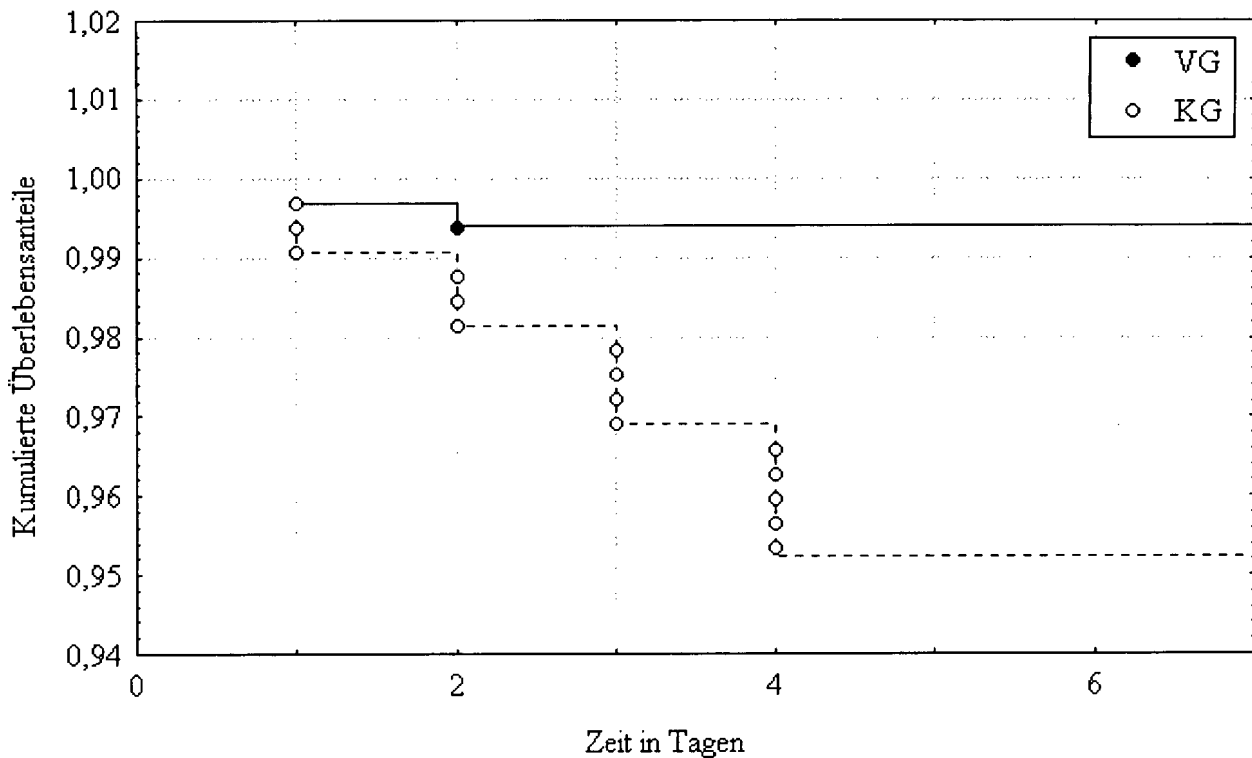
#### 1.1.3.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung

[0038] In Bezug auf die Verluste in den Gruppen gibt es beachtliche Unterschiede ( $p < 0,0005$ , Cox-F-Test). Bis zum Versuchsende am Tag 4 waren in der Versuchsgruppe (N = 322) 2 Stückverluste (0,6%), in der Kontrollgruppe (N = 322) 15 Stückverluste (4,7%) zu verzeichnen. In der Versuchsgruppe starben ab dem Tag 3 keine Fische mehr. Dagegen stiegen in der Kontrollgruppe die täglichen Verluste leicht bis zum Versuchsende an. Nach Beendigung der Versuche wurde die Kontrollgruppe aufgrund des unzureichenden Gesundheitszustandes in den Aufzuchtteich zurückgesetzt. Die Fische der Versuchsgruppe gelangten zum Verkauf. Innerhalb der nächsten 4 Wochen traten in der Versuchsgruppe keine weiteren Todesfälle auf.

[0039] Tab. 1: Überleben von multifaktoriell erkrankten Goldfischen im Versuch I: Bei jeweils N = 322 in der Versuchsgruppe (VG) und Kontrollgruppe (KG) sind innerhalb von 4 Tagen 2 Fische der Versuchsgruppe (0,6%) und 15 Fische der Kontrollgruppe (4,7%) verendet.

Untersuch.	Überleben				
	VG (N=322)		KG (N=322)		
Tag	Bestand	Verluste	Bestand	Verluste	
	N	n	N	n	
1	321	1	319	3	
2	320	1	316	3	
3	320	0	312	4	
4	320	0	307	5	
Resultat	320	2	307	15	
Cox-F-Test	p<0,0005				

Überleben von multifaktoriell erkrankten Goldfischen (Versuch I)  
Kumulierte Überlebensanteile (Kaplan-Meier)



[0040] **Abb. 1:** Überleben von multifaktoriell erkrankten Goldfischen im Versuch I: Kumulierte Überlebensanteile nach Kaplan-Meier in der Versuchsgruppe (durchgezogene Linie) und Kontrollgruppe (gestrichelte Linie) bei jeweils N = 322. Innerhalb von 4 Tagen sind 2 Fische der Versuchsgruppe (0,6%) und 15 Fische der Kontrollgruppe (4,7%) gestorben. Unterschied hoch signifikant mit  $p < 0,0005$  (Cox-F-Test).

[0041] Bei den Fischen beider Gruppen waren geschwürige Hautveränderungen, Hämorrhagien in der Haut und den Flossen, Flossenrandnekrosen und nach bestehender Vorschädigung Pilzbefall vorhanden. Erkrankungen der Kiemen waren durch Schwellungen, Rötungen, graue Schleimbeläge, Anämie und Randnekrosen gekennzeichnet.

[0042] Bei den Fischen der Versuchsgruppe zeigte sich unter der HS-Behandlung eine beschleunigte Heilung in Form von Demarkations- und Reparationserscheinungen bei den Kiemen-, Flossen- und Hautläsionen. Nach vier HS-Behandlungen waren Krankheitssymptome wie Flossenrandnekrosen und Hautläsionen überwiegend abgeheilt oder in der Abheilung begriffen. Die Entzündungssymptome waren in den Kiemen der Versuchsfische abgeklungen. Die pilzinfizierten Fische der Versuchsgruppe besaßen eine gering- bis mittelgradige umschriebene Dermatomykose, insbesondere an den Körperseiten bzw. Flossen. Infektionen durch Pilze äußerten sich bei den Fischen der Kontrollgruppe in einer generalisierten Mykose mit ausgeprägter Dermatitis.

[0043] Die Fische beider Gruppen besaßen reichlich Viszeralfett. Schwimmblase sowie parenchymatöse Organe und Magen-Darm-Kanal waren unauffällig. Nur moribunde und verendete Fische besaßen einen klaren gelblichen gallertigen und teilweise aufgegastrten Darminhalt sowie eine Hyperämie bzw. multiple Petechien und Ekchymosen an der Schwimmblasenwand.

#### Zusammenfassende Befundauswertung

[0044] Insgesamt wurden 644 Fische untersucht. Vier Tage nach Beginn der HS-Behandlung in der Versuchsgruppe wiesen 62,4% dieser Fische entweder keine oder überwiegend in Abheilung befindliche Organ-, insbesondere Haut-, Flossen- und Kiemenveränderungen auf. Bei 31,7% der Fische aus der Versuchsgruppe traten geringgradige, bei 4,3% mittelgradige und bei 1,6% hochgradige klinische Symptome auf.

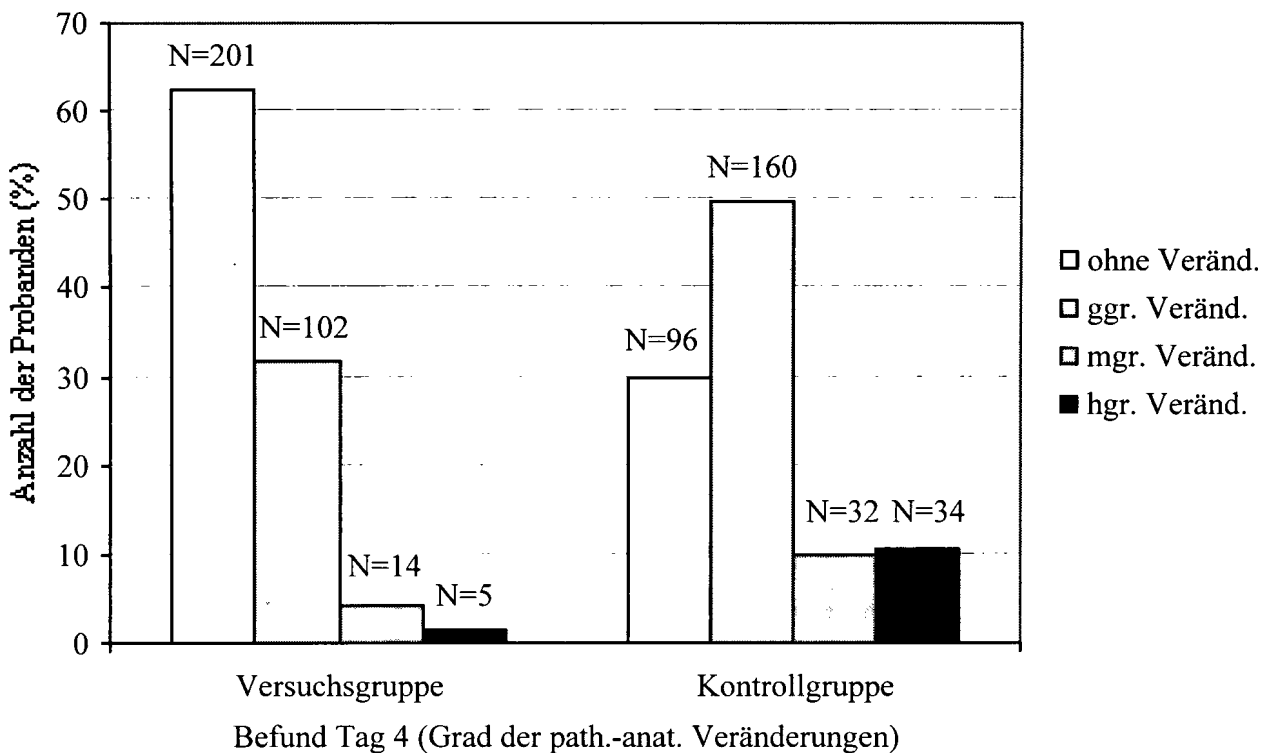
[0045] Bei den unbehandelten Fische besaßen nur 29,8% entweder keine oder überwiegend in Abheilung befindliche Organ-, insbesondere Haut-, Flossen- und Kiemenveränderungen. 49,7% der nicht behandelten Fische hatten geringgradige, 9,9% mittelgradige und 10,6% hochgradige klinische Symptome.

[0046] Es zeigte sich eine geringgradigere Ausprägung ( $p < 1 \cdot 10^{-16}$ ) des Krankheitsgeschehens nach der HS-Behandlung (s. Tab. 2 und **Abb. 1**).

[0047] Tab. 2: Pathologisch-anatomische Untersuchung: Zusammenfassende Befundauswertung bis zum Tag 4. Gesamtbefund aller Fische der Versuchs- und Kontrollgruppe mit jeweils N = 322. Prävalenz der Fische

ohne Veränderungen (Score 0) sowie mit geringgradigen (Score I), mittelgradigen (Score II) und hochgradigen Veränderungen (Score III).

Untersuchung		Gesamtbefund			
Tag	Score	VG (N=322)		KG (N=322)	
		n	%	n	%
4	0	201	62,4	96	29,8
	I	102	31,7	160	49,7
	II	14	4,3	32	9,9
	III	5	1,6	34	10,6
c2-Hom.-T.		$p < 1 \cdot 10^{-16}$			



[0048] **Abb. 2:** Pathologisch-anatomische Untersuchung: Zusammenfassende Befundauswertung aller Fische bis zum Tag 4 in der Versuchsgruppe (links) und Kontrollgruppe (rechts) mit jeweils N = 322. Auftreten von keinen (weiß), geringgradigen (hellgrau), mittelgradigen (dunkelgrau) und hochgradigen Veränderungen (schwarz). Über den Säulen Prävalenz der dem Grad der Veränderung zugeteilten Probanden. Unterschied zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe hoch signifikant mit  $p < 1 \cdot 10^{-16}$  ( $\chi^2$ -Homogenitätstest-Test).

### 1.1.3.2 Histologische Untersuchung

[0049] Histologisch wurden bei den erkrankten Versuchsfischen Hyphen sowie entzündliche Infiltrate in der Haut bzw. Unterhaut nachgewiesen.

[0050] Die histologische Untersuchung der Kontrollfische erbrachte den Nachweis von Hyphen in der Haut, Unterhaut und der angrenzenden Muskulatur sowie eine starke Infiltration des Entzündungsgebietes mit neutrophilen Granulozyten, Lympho- und Histiozyten.

1.1.3.3 Bakteriologische Untersuchung

[0051] Durch die bakteriologische Untersuchung der Organe, Haut bzw. Kiemen der Fische wurden in beiden Gruppen bewegliche Aeromonaden (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. schubertii*) nachgewiesen. In der Versuchsgruppe waren die Keime in geringer- bis mittlerer Anzahl in der Haut, in der Kontrollgruppe in hoher Anzahl in der Haut und den Kiemen vorhanden.

[0052] In der Kontrollgruppe wurde außerdem bakterioskopisch in den Kiemen eines erkrankten Fisches mit Kiemenrötung, vermehrter Schleimbildung sowie Flossenrandnekrosen ein geringgradiger Myxobakterienbefall festgestellt.

1.1.3.4 Mykologische Untersuchung

[0053] Die mykologische Untersuchung erbrachte bei beiden Fischgruppen den Nachweis von Pilzen der Gattung *Saprolegnia* sp.

1.1.3.5 Nebenwirkungen bei der Behandlung

[0054] Es konnten keinerlei Nebenwirkungen während und nach der Behandlung festgestellt werden.

1.1.4 Versuch II: Ergebnisse

1.1.4.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung

1.1.4.1.1 Verlustgeschehen

[0055] Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Verluste ( $p > 0,05$ ). In der Versuchsgruppe ( $N = 100$ ) kam es zu 8 Stückverlusten (8%). In der Kontrollgruppe ( $N = 100$ ) waren 16 Stückverluste (16%) zu verzeichnen.

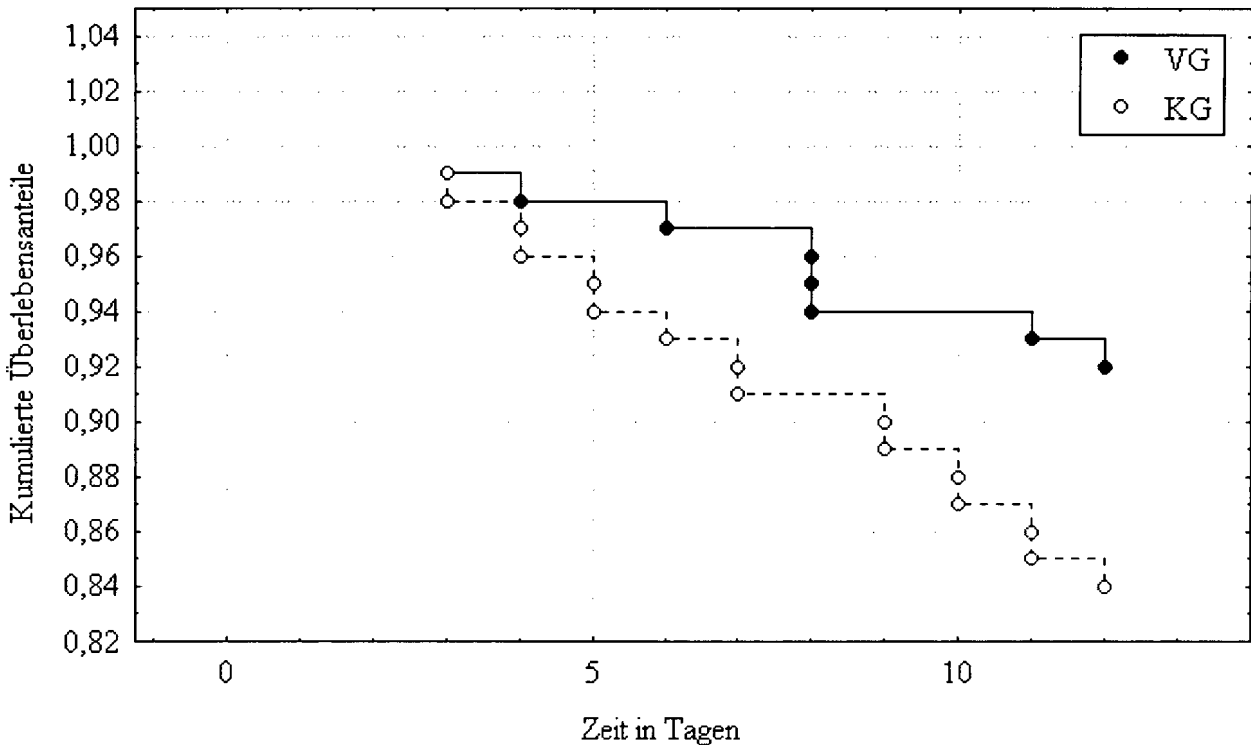
[0056] Die Verluste traten in beiden Gruppen ab dem Tag 3 und unregelmäßig auf. In der Versuchsgruppe kam es am Tag 8 mit 3 Verlusten zu einem geringen Anstieg (s. Nebenwirkungen bei der Behandlung).

[0057] Tab. 3.: Überleben von multifaktoriell erkrankten Goldfischen im Versuch II: Bei jeweils  $N = 100$  sind in der Versuchsgruppe (VG) und Kontrollgruppe (KG) innerhalb von 12 Tagen 8 Fische der Versuchsgruppe (8%) und 16 Fische der Kontrollgruppe (16%) verendet.

Untersuch.	Überleben				
Tag	VG (N=100)			KG (N=100)	
	Bestand	Verluste	Bestand	Verluste	
	N	n	N	n	
1	100	0	100	0	
2	100	0	100	0	
3	99	1	98	2	
4	98	1	96	2	
5	98	0	94	2	
6	97	1	93	1	
7	97	0	91	2	
8	94	3	91	0	
9	94	0	89	2	
10	94	0	87	2	
11	93	1	85	2	
12	92	1	84	1	
Resultat	92	8	84	16	
Cox-F-Test	p<0,05				

## Überleben von multifaktoriell erkrankten Goldfischen (Versuch II)

## Kumulierte Überlebensanteile (Kaplan-Meier)



[0058] **Abb. 3:** Überleben von multifaktoriell erkrankten Goldfischen im Versuch II: Kumulierte Überlebensanteile nach Kaplan-Meier in der Versuchsgruppe (durchgezogene Linie) und Kontrollgruppe (gestrichelte Linie) bei jeweils N = 100. Innerhalb von 12 Tagen sind 8 Tiere der Versuchsgruppe (8%) und 16 Tiere der Kontrollgruppe (16%) verendet. Unterschied signifikant mit  $p < 0,05$  (Cox-F-Test).

[0059] Bei den folgenden Ergebnissen ist die Aufteilung der Fische nach der Ausprägung der Symptome den jeweiligen Tabellen zu entnehmen. Die Ergebnisse des  $\chi^2$ -Homogenitäts-Tests sind mit der Power p angegeben. Dabei wurde für  $p < 0,05$  schwach signifikant,  $p < 0,01$  signifikant und  $p < 0,001$  hoch signifikant zu Grunde gelegt.

## 1.1.4.1.2 Untersuchung der Haut

[0060] Gefäßstauungen in Form einer aktiven Hyperämie der Haut kamen sowohl großflächig an den Körperseiten und dem unteren Körperbereich, als auch begrenzt vor, in letzterem Fall in Verbindung mit einer örtlichen Entzündung (Ulkus). Die Prävalenz der Gefäßstauungen betrug am Tag 8 bei den Versuchsfischen 3% und bei den Kontrollfischen 6%. Bis zum Tag 12 verringerte sich die Inzidenz jeweils um 2%.

[0061] Es wurden zwei verschiedene Formen der Blutungen festgestellt. Einmal kam die Haemorrhagia per diapedesin vor, die durch Petechien und Ekchymosen gekennzeichnet war. Die Diapedeseblutungen traten hauptsächlich in der Abdominalgegend, im unteren Kopf- und Kiemendeckelbereich und an den Flossenansätzen auf.

[0062] Die zweite festgestellte Blutungsform war die Haemorrhagia per rhexin. Diese war in der Unterform der Arrosionsblutung ausgeprägt und wird als Haemorrhagia per diabrosin bezeichnet. Das Vorkommen der Arrosionsblutung beschränkte sich auf Zusammenhangstrennungen der Hautgewebe, insbesondere bei den Ulzera.

[0063] Die Diapedeseblutungen unterschieden sich am Tag 8 mit einer Prävalenz von 7% in der Versuchsgruppe gegenüber 19% in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Am Tag 12 traten Diapedeseblutungen bei 11% der Versuchs- und 10% der Kontrollfische auf.

[0064] Am Tag 8 betrug die Prävalenz der Arrosionsblutungen bei den Versuchsfischen wie bei den Kontrollfischen 6%. Auch am Tag 12 unterschieden sich die Prävalenzen mit 10% in der Versuchs- und 11% in der Kontrollgruppe nur geringfügig. Die Arrosionsblutungen der Haut kamen meist am Rand von geschwürigen Veränderungen vor.

[0065] Diese geschwürigen Veränderungen (Ulzera) entwickelten sich aus einer oberflächlichen kreisförmigen Entzündung der Haut. Mit dem Voranschreiten der Entzündung wurden die Hautpartien nekrotisch. Im fortgeschrittenen Stadium der Ulzera war zusätzlich die Muskulatur betroffen und im Endstadium bei entsprechen-

der Lokalisation die Bauchhöhle eröffnet. Die Prävalenz betrug am Tag 8 in der Versuchsgruppe 9%, in der Kontrollgruppe 14%. Am Tag 12 lag die Inzidenz in beiden Gruppen bei 1%, wobei sich jedoch bei den Kontrollfischen der Anteil der stärker erkrankten Tiere deutlich erhöhte (s. Tab 4a).

[0066] Mykosen der Haut traten als sekundäre Erscheinungen auf, vor allem bei Ulzerationen und Schleimhautläsionen. Während sich am Tag 8 der Anteil Fische mit Verpilzungen der Haut noch auf 4% in der Versuchs- und 8% Kontrollgruppe belief, konnte bis zum Tag 12 ein Unterschied mit 5% in der Versuchs- und 13% in der Kontrollgruppe festgestellt werden ( $p < 0,05$ ).

[0067] Tab. 4a: Pathologisch-anatomische Untersuchung: Hautbefunde aller Fische bis zum Tag 8 sowie 12 in der Versuchs- und Kontrollgruppe mit jeweils N = 100. Prävalenz der Fische mit Gefäßstauungen, Diapedeseblutungen, Arrosionsblutungen, geschwürigen Veränderungen und Mykosen. Auftreten von keinen (Score 0), geringgradigen (Score I), mittelgradigen (Score II) und hochgradigen Veränderungen (Score III).

Untersuchung		Haut									
Tag	Score	Gefäßst.		Diap.-blt.		Arr.-blt.		GV		Mykosen	
		VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG
8	0	97	93	93	81	94	94	91	86	96	92
	I	1	5	5	16	1	3	5	4	3	2
	II	2	2	2	3	5	3	2	5	0	3
	III	0	0	0	0	0	0	2	5	1	3
	$\chi^2$ -Hom.-T.	n.s.		p<0,05		n.s.		n.s.		n.s.	
12	0	99	89	89	90	90	89	90	85	95	87
	I	1	6	6	5	7	7	5	2	4	2
	II	0	3	3	2	3	3	2	6	0	6
	III	0	2	2	3	0	1	3	7	1	5
	$\chi^2$ -Hom.-T.	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		p<0,05	

#### 1.1.4.1.3 Untersuchung der Flossen

[0068] Von den Gefäßstauungen waren allgemein die gesamte Flosse, bei paariger Anlage das Flossenpaar bzw. bis zu alle Flossen betroffen. Die Hyperämie ging von der Flossenwurzel aus. Am Tag 8 belief sich die Prävalenz in der Versuchsgruppe auf 26%, in der Kontrollgruppe auf 21%. Bis zum Tag 12 verringerte sich die Inzidenz um 11% in der Versuchs- und 12% in der Kontrollgruppe.

[0069] Trübungen der Schleimhaut der Flossen kamen nur in geringgradiger Ausprägung vor. Am Tag 8 waren in der Versuchsgruppe 6% und in der Kontrollgruppe 4% der Fische betroffen, am Tag 12 dann 5% in der Versuchs- und 7% in der Kontrollgruppe.

[0070] Diapedeseblutungen waren in Form von Petechien, Ekchymosen bis hin zu Suggilationen zu verzeichnen. Ein klarer Unterschied im Anteil der Fische mit Diapedeseblutungen wurde am Tag 8 sichtbar. Von den Versuchsfischen waren 2%, von den Kontrollfischen 20% betroffen ( $p < 0,001$ ). Auch bis zum Tag 12 war ein Unterschied mit einer Prävalenz von 1% bei den Versuchs- und 9% bei den Kontrollfischen sichtbar ( $p < 0,02$ ).

[0071] Die Diapedeseblutungen waren abzugrenzen von Arrosionsblutungen, die meist in Verbindung mit nekrotischen Flossenrändern und Läsionen am Unterteil der paarigen Flossen auftraten. Arrosionsblutungen wurden bis zum Tag 8 in der Versuchsgruppe bei 7% und in der Kontrollgruppe bei 8% der Fische festgestellt. Durch die Untersuchung am Tag 12 wurde ein Unterschied deutlich, nach dem die Prävalenz in der Versuchsgruppe bei 9% und in der Kontrollgruppe bei 24% lag ( $p < 0,05$ ).

[0072] Am Tag 2 wurden in der Kontrollgruppe weiße Flossenränder auffällig. Davon ausgehend kam es zur Flossenregression zwischen den Flossenstrahlen („Ausfransung“). Die Flossen verkleinerten sich im Verlaufe der Flossenfäule durch progressiven Zelltod. Bis zum Tag 8 waren von den Flossenrandnekrosen in der Versuchsgruppe 14% der Fische betroffen, im Unterschied dazu in der Kontrollgruppe 31% ( $p < 0,05$ ). Der Unterschied verstärkte sich bis zum Tag 12 mit einer Prävalenz von 21% in der Versuchs- und 47% in der Kontrollgruppe ( $p < 0,002$ ).

[0073] Die Mykosen der Flossen traten sekundär an vorgeschädigten Partien der Flossenränder auf. Bis zum Tag 8 konnten in der Versuchsgruppe bei 1% der Fische eine Flossenverpilzung und nur in geringgradiger Ausprägung festgestellt werden. In der Kontrollgruppe lag die Prävalenz bei 7%, wobei gering-, mittel- und hochgradige Befälle festgestellt wurden. Bis zum Tag 12 betrug die Inzidenz in beiden Gruppen 1%.

[0074] Tab. 4b: Pathologisch-anatomische Untersuchung: Flossenbefunde aller Fische bis zum Tag 8 sowie 12 in der Versuchs- und Kontrollgruppe mit jeweils  $N = 100$ . Prävalenz der Fische mit Gefäßstauungen, Schleimhauttrübungen, Diapedeseblutungen, Arrosionsblutungen, Flossenrandnekrosen und Mykosen. Auftreten von keinen (Score 0), geringgradigen (Score I), mittelgradigen (Score II) und hochgradigen Veränderungen (Score III).

Untersuchung		Flossen											
Tag	Score	Gefäßst.		Trübung		Diap.-blt.		Arr.-blt.		FRN		Mykosen	
		VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG
8	0	74	79	94	96	98	80	93	92	86	69	99	93
	I	16	17	6	4	1	11	5	3	7	14	1	2
	II	8	4	0	0	1	7	1	3	5	11	0	2
	III	0	0	0	0	0	2	1	2	2	6	0	3
	$\chi^2$ -Hom.-T.	n.s.		n.s.		p<0,001		n.s.		p<0,05		n.s.	
12	0	85	91	99	93	99	91	91	76	79	53	98	92
	I	15	9	0	7	0	6	6	16	15	31	2	3
	II	0	0	0	0	0	3	2	7	3	10	0	2
	III	0	0	1	0	1	0	1	1	3	6	0	3
	$\chi^2$ -Hom.-T.	n.s.		n.s.		p<0,02		p<0,05		p<0,002		n.s.	

#### 1.1.4.1.4 Untersuchung der Kiemen

[0075] Anfangssymptome einer Erkrankung der Kiemen waren Rötungen, Schwellungen und eine gesteigerte Schleimsekretion.

[0076] Rötungen (Hyperämien) als Ausdruck von Blutstauungen in den Kiemengefäßen wurden bis zum Tag 8 in der Versuchsgruppe bei 1% der Fische festgestellt. Bis zum Tag 12 konnten die Kiemenrötungen nur bei den Kontrollfischen mit einer Prävalenz von 4 % nachgewiesen werden.

[0077] Schwellungen konnten durch die Untersuchung am Tag 8 nicht festgestellt werden. Bis zum Tag 12 entwickelten sich in der Kontrollgruppe bei 7% der Fische Kiemenschwellungen.

[0078] Eine gesteigerte Schleimsekretion konnten nur in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Bis zum Tag 8 besaßen 1% , bis zum Tag 12 4% der Kontrollfische eine gesteigerte Schleimsekretion.

[0079] Hämorrhagien kamen bis zum Tag 8 mit einer Prävalenz von 1% in der Versuchsgruppe, bis zum Tag 12 mit einer Prävalenz von 1% in der Versuchs- und 2% in der Kontrollgruppe vor.

[0080] Anämische, blasse Kiemen wurden bis zum Tag 8 bei 1% der Versuchs- und 4% der Kontrollfische festgestellt. Bis zum Tag 12 betrug die Inzidenz in der Versuchsgruppe 1 %, in der Kontrollgruppe 4%.

[0081] Kiemennekrosen kamen vorwiegend am Rand der Kiemenbögen vor, seltener als punktförmige stecknadelkopfgroße Veränderungen, wie sie nach Befall mit Dactylogyriden auftreten. Bei hochgradiger Erkrankung war ein großflächiger Verlust von Teilen des Parenchyms und des Stromas zu beobachten. In der Versuchsgruppe betrug die Prävalenz 10% bis zum Tag 8, in der Kontrollgruppe 22%. Bis zum Tag 12 waren noch 4% der Versuchsfische betroffen, von den Kontrollfischen 14%.

[0082] Mykosen waren an chronisch vorgeschädigten Kiemen bis zum Tag 8 bei 1% der Versuchs- und 2% der Kontrollfische nachweisbar. Bis zum Tag 12 betrug die Inzidenz in der Versuchsgruppe 0%, in der Kontrollgruppe 3%.

[0083] Tab. 4c: Pathologisch-anatomische Untersuchung: Kiemenbefunde aller Fische bis zum Tag 8 sowie 12 in der Versuchs- und Kontrollgruppe mit jeweils N = 100. Prävalenz der Fische mit Rötungen, Schwellungen, vermehrten Schleimsekretionen, Blutungen, Anämien, Kiemennekrosen und Mykosen. Auftreten von keinen (Score 0), geringgradigen (Score I), mittelgradigen (Score II) und hochgradigen Veränderungen (Score III).

Untersuchung		Kiemen													
Tag	Score	Rötung		Schwell.		Schleim		Blutung.		Anämie		KN		Mykosen	
		VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG
8	0	99	100	100	100	100	99	99	100	99	96	90	78	99	98
	I	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	6	11	1	1
	II	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	11	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	$\chi^2$ -Hom.-T.	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
12	0	100	96	100	93	100	96	99	98	98	92	96	86	99	95
	I	0	1	0	4	0	3	1	0	2	5	2	9	1	3
	II	0	1	0	2	0	1	0	2	0	3	2	3	0	0
	III	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
	$\chi^2$ -Hom.-T.	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	

#### 1.1.4.1.5 Zusammenfassende Befundauswertung

[0084] Bei der Ausprägung der Hämorrhagien ergaben sich bis zum Tag 8 deutlich unterschiedliche Anteile von 20% der Fische in der Versuchs- und 45% der Fische in der Kontrollgruppe ( $p < 0,002$ ). Ein Unterschied war auch bis zum Tag 12 vorhanden, bis zu dem in der Versuchsgruppe 26% und in der Kontrollgruppe 52% der Fische Blutungen aufwiesen ( $p < 0,02$ ).

[0085] Die Beurteilung aller festgestellten nekrotischen Veränderungen an der Haut (Ulzera), der Flossen (Flossenrandnekrosen) und der Kiemen (Kiemennekrosen) ergab bis zum Tag 8 eine Prävalenz von 24% in der Versuchs- und 47% in der Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ). Bis zum Tag 12 betrug die Prävalenz 29% bei den Versuchs- und 69% bei den Kontrollfischen ( $p < 0,0001$ ).

[0086] Mykosen kamen an der Haut, den Flossen und den Kiemen zusammen bis zum Tag 8 bei 4% der Versuchs- und 11% der Kontrollfische vor. Bis zum Tag 12 unterschieden sich die Prävalenzen mit 6% in der Versuchs- und 17% in der Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ). Die Prävalenz der Symptome einer akuten Kiemenentzündung Rötung, Schwellung und verstärkte Schleimsekretion lag bis zum Tag 8 bei jeweils 1% in der Versuchs- und Kontrollgruppe. Bis zum Tag 12 betrug die Prävalenz 0% bei den Versuchs- und 10% bei den Kontrollfischen.

[0087] Tab. 4d: Pathologisch-anatomische Untersuchung: Zusammenfassende Befundauswertung aller Fische bis zum Tag 8 sowie 12 in der Versuchs- und Kontrollgruppe mit jeweils N = 100. Prävalenz der Fische mit Blutungen, Nekrosen, Verpilzungen und akuten Kiemenentzündungen. Auftreten von keinen (Score 0), geringgradigen (Score I), mittelgradigen (Score II) und hochgradigen Veränderungen (Score III).

Untersuchung		Blutung.		Nekros.		Verpilzg.		akute KE	
Tag	Score	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG
8	0	80	55	76	53	96	89	99	99
	I	11	28	12	19	3	3	0	1
	II	8	13	8	16	0	4	1	0
	III	1	4	4	12	1	4	0	0
	$\chi^2$ -Hom.-T.	p<0,002		p<0,01		n.s.		n.s.	
12	0	74	48	71	31	94	83	100	90
	I	18	24	18	28	5	4	0	4
	II	5	14	5	12	0	7	0	3
	III	3	4	6	13	1	6	0	3
	$\chi^2$ -Hom.-T.	p<0,02		p<0,0001		p<0,01		p<0,02	

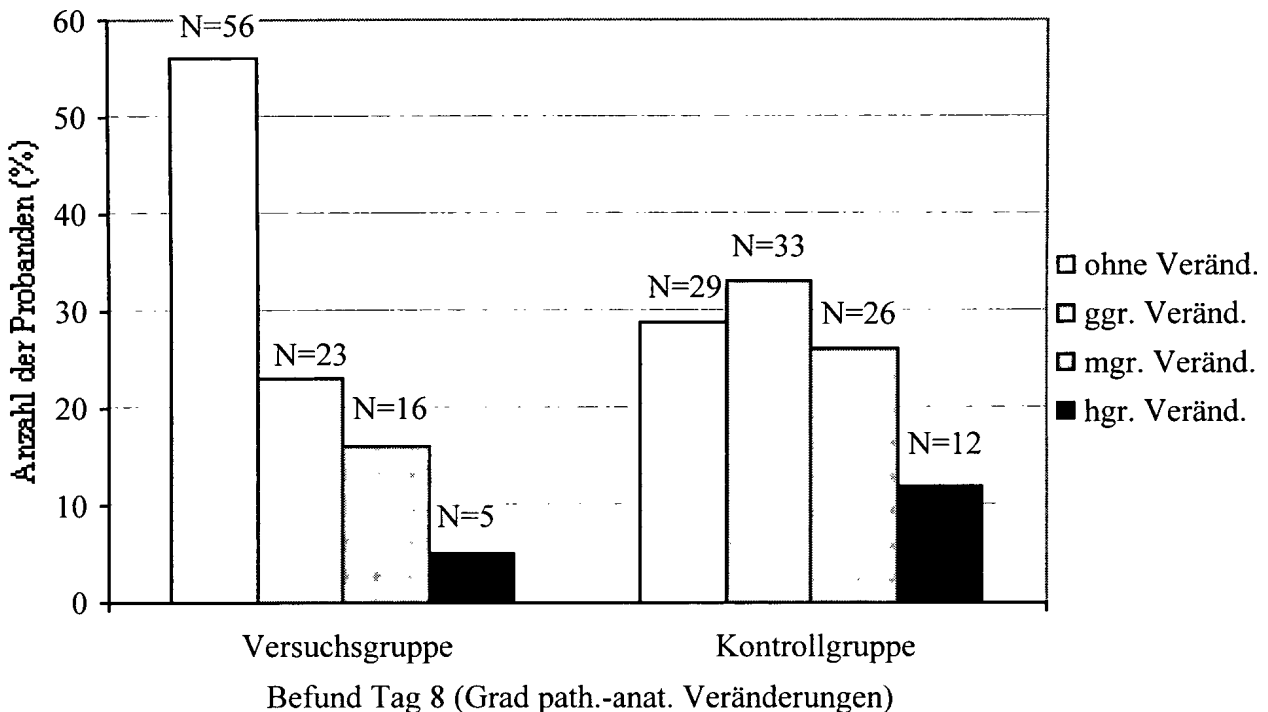
[0088] Durch die Zusammenfassung aller der bei der Untersuchung der Haut und den Flossen festgestellten Symptome ergab sich bis zum Tag 8 eine Prävalenz von 42% in der Versuchs- und 71% in der Kontrollgruppe ( $p < 0,0005$ ). Bis zum Tag 12 betrug die Prävalenz bei den Versuchsfischen 51%, bei den Kontrollfischen 67% ( $p < 0,02$ ).

[0089] Bei den Kiemen betrug die Prävalenz von Krankheitssymptomen bis zum Tag 8 in der Versuchsgruppe 12% und in der Kontrollgruppe 27% ( $p < 0,05$ ). Der Anteil an den Kiemen erkrankter Fische lag bis zum Tag 12 bei einem Anteil von 6% der Versuchs- und 27% der Kontrollfische (s. Tab. 4e).

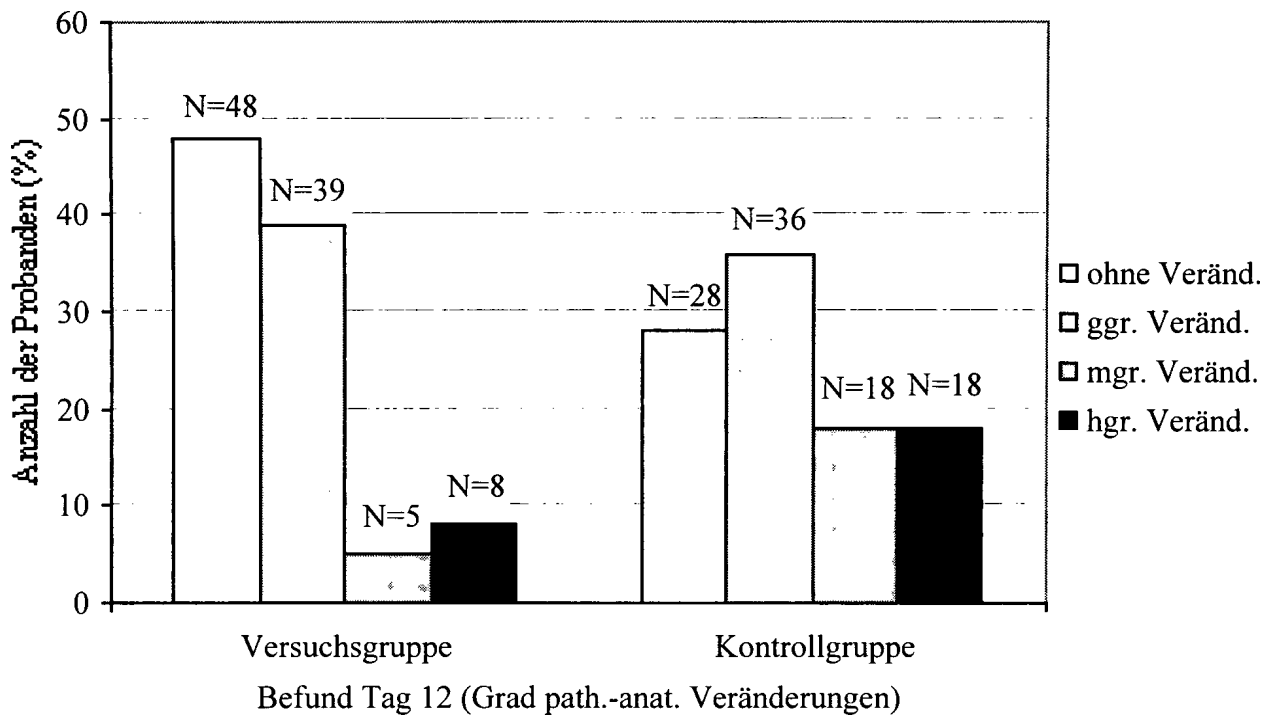
[0090] Betrachtet man alle untersuchten Symptome, ergibt sich der Gesamtbefund. Demnach waren 44% der Versuchsfische und 71% der Kontrollfische bis zum Tag 8 erkrankt. Bis zum Tag 12 traten in der Versuchsgruppe bei 52% und in der Kontrollgruppe bei 72% der Fische Krankheitssymptome auf. In der Versuchsgruppe dominierten die Fische ohne Krankheitssymptome, in der Kontrollgruppe die mit geringgradigen Krankheitssymptomen (s. Tab. 4e).

[0091] Tab. 4e: Pathologisch-anatomische Untersuchung: Zusammenfassende Befundauswertung aller Fische bis zum Tag 8 und 12 in der Versuchs- und Kontrollgruppe mit jeweils  $N = 100$ . Prävalenz der Fische mit Veränderungen der Haut inkl. der Flossen, der Kiemen sowie der Gesamtbefund. Auftreten von keinen (Score 0), geringgradigen (Score I), mittelgradigen (Score II) und hochgradigen Veränderungen (Score III).

Untersuchung		Haut u.		Kiemen		Gesamt- befund	
Tag	Score	Flossen		VG	KG	VG	KG
		VG	KG				
8	0	58	29	88	73	56	29
	I	22	37	9	13	23	33
	II	13	20	3	13	16	26
	III	5	14	0	1	5	12
$\chi^2$ -Hom.-T.		p<0,0005		p<0,05		p<0,002	
12	0	49	33	94	73	48	28
	I	38	37	4	13	39	36
	II	4	14	2	8	5	18
	III	9	16	0	6	8	18
$\chi^2$ -Hom.-T.		p<0,02		p<0,001		p<0,001	



[0092] **Abb. 4:** Pathologisch-anatomische Untersuchung: Zusammenfassende Befundauswertung bis zum Tag B. Gesamtbefund aller Fische der Versuchsgruppe (links) und Kontrollgruppe (rechts) mit jeweils N = 100. Auftreten von keinen (weiß), geringgradigen (hellgrau), mittelgradigen (dunkelgrau) und hochgradigen (schwarz) Veränderungen. Über den Säulen Prävalenz der dem Grad der Veränderung zugeteilten Probanden. Unterschied zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe hoch signifikant mit  $p < 0,002$  ( $\chi^2$ -Homogenitätstest-Test).



[0093] **Abb. 5:** Pathologisch-anatomische Untersuchung: Zusammenfassende Befundauswertung bis zum Tag 12. Gesamtbefund aller Fische der Versuchsgruppe (links) und Kontrollgruppe (rechts) mit jeweils N = 100. Auftreten von keinen (weiß), geringgradigen (hellgrau), mittelgradigen (dunkelgrau) und hochgradigen (schwarz) Veränderungen. Über den Säulen Prävalenz der dem Grad der Veränderung zugeteilten Probanden. Unterschied zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe hoch signifikant mit  $p < 0,001$  ( $\chi^2$ -Homogenitätstest-Test).

#### 1.1.4.2 Parasitologische Untersuchung

[0094] Es wurde ein Befall der Haut mit *Ichthyobodo* sp., *Chilodonella* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Trichodina* sp., *Gyrodactylus* sp. und *Argulus* sp. festgestellt. In den Kiemen wurden *Ichthyobodo* sp., *Chilodonella* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Trichodina* sp. und *Dactylogyrus* sp. nachgewiesen.

[0095] In der Versuchsgruppe besaßen 80% (8/10) der untersuchten Fische insgesamt einen geringgradigen Befall der Haut mit Ektoparasiten, die restlichen 20% (2/10) einen mittelgradigen Befall. Die Kiemen waren zu 10% (1/10) nicht, zu 80% (8/10) geringgradig und zu 10% (1/10) hochgradig mit Ektoparasiten befallen (s. Tab. 5a).

[0096] In der Kontrollgruppe war die Haut der untersuchten Fische insgesamt zu 21,4% (3/14) geringgradig, zu 71,4% (10/14) mittelgradig und zu 7,1% hochgradig mit Ektoparasiten befallen. Die Kiemen wiesen insgesamt zu 7,1% einen geringgradigen, zu 50% einen mittelgradigen und zu 42,9% einen hochgradigen Befall auf (s. Tabelle 5a).

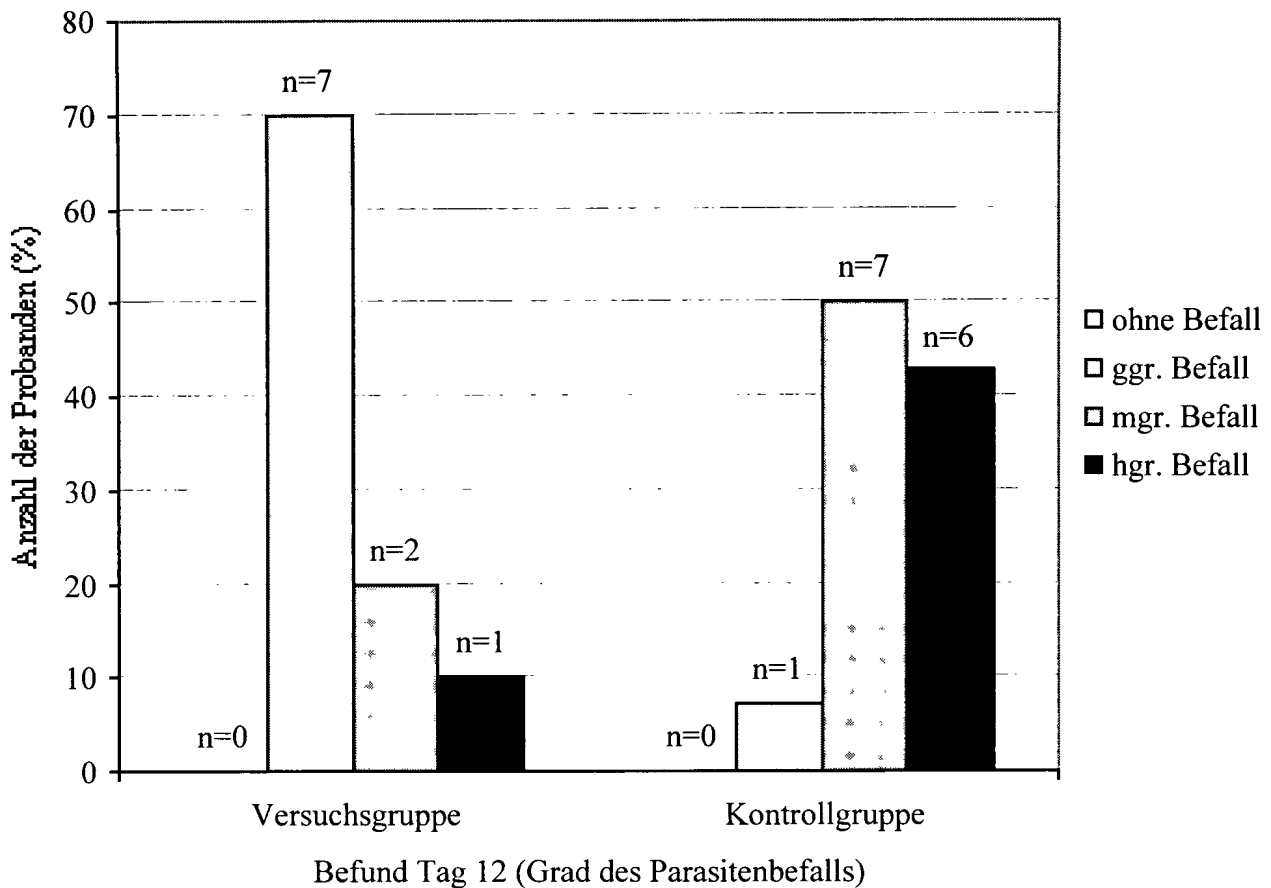
[0097] Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Parasitierung der Haut insgesamt mit *Ichthyobodo* sp., *Chilodonella* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Trichodina* sp., *Gyrodactylus* sp. und *Argulus* sp. ( $p < 0,02$ ). Bei den Kiemen wurde insgesamt der Unterschied im Befall mit den Ektoparasiten *Ichthyobodo* sp., *Chilodonella* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Trichodina* sp. und *Dactylogyrus* sp. geringfügig deutlicher ( $p > 0,01$ ). Hier stellte sich allein schon ein Unterschied im Auftreten von *Ichthyophthirius* sp. heraus ( $p < 0,05$ ). So war in der Versuchsgruppe *Ichthyophthirius* sp. auf den Kiemen nicht nachweisbar, wogegen in der Kontrollgruppe 35,7% (5/14) der Fische geringgradig und 14,3% mittelgradig befallen waren.

[0098] Zusammengefasst ergibt sich für den Gesamtbefund der ektoparasitologischen Untersuchung ein Unterschied zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ). In der Versuchsgruppe waren 70% (7/10) der Fische geringgradig, 20% mittelgradig und 10% (1/10) hochgradig parasitiert. Dagegen wurde in der Kontrollgruppe bei 7,1% (3/14) ein geringgradiger, bei 50% ein mittelgradiger und bei 42,9% ein hochgradiger Befall nachgewiesen (s. Tab. 5a).

[0099] Tab. 5a: Parasitologische Untersuchung: Befall mit Ektoparasiten bis zum Tag 12 bei Fischen in der Versuchsgruppe (n = 10) und Kontrollgruppe (n = 14). Prävalenz der Fische mit *Ichthyobodo* sp., *Chilodonella* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Trichodina* sp., *Gyrodactylus* sp., *Argulus* sp. und *Dactylogyrus* sp. auf der Haut, den Kiemen und zusammenfassende Befundauswertung des Haut-, Kiemenbefundes sowie Gesamtbefund. Auftreten von keinem (Score 0), geringgradigem (Score I), mittelgradigem (Score II) und hochgradigem Befall

(Score III).

Untersuchung	Haut													
Score	Ichthyob.		Chilod.		Ichthpht.		Trichod.		Gyrod.		Argulus		Zusf.	
	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG
0	6	4	9	10	6	9	0	1	5	6	10	12	0	0
I	4	3	1	1	4	4	8	9	5	8	0	1	8	3
II	0	6	0	3	0	1	2	4	0	0	0	1	2	10
III	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
$\chi^2$ -Hom.-Test	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		p<0,02	
Untersuchung	Kiemen											Gesamt- befund		
Score	Ichthyob.		Chilod.		Ichthpht.		Trichod.		Dactyl.		Zusf.			
	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG
0	5	3	7	4	10	7	5	1	3	2	1	0	0	0
I	5	10	2	3	0	5	5	11	7	8	8	3	7	1
II	0	1	0	1	0	2	0	1	0	3	0	5	2	7
III	0	0	1	6	0	0	0	1	0	1	1	6	1	6
$\chi^2$ -Hom.-Test	n.s.		n.s.		p<0,05		n.s.		n.s.		p<0,01		p<0,01	



[0100] **Abb. 6:** Parasitologische Untersuchung: Zusammenfassende Befundauswertung bis zum Tag 12. Gesamtbefund des Befalls mit Ektoparasiten der Versuchsgruppe (n = 10; links) und Kontrollgruppe (n = 14; rechts) mit jeweils N = 100. Auftreten von keinem (weiß), geringgradigem (hellgrau), mittelgradigem (dunkelgrau) und hochgradigem Befall (schwarz). Über den Säulen die Prävalenz der den Befallsgraden zugeteilten Probanden. Unterschied zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe signifikant mit  $p < 0,01$  ( $\chi^2$ -Homogenitätstest).

[0101] Als Nebenbefund wurden ab dem Tag 3 die Blutparasiten *Trypanosoma* sp. in Hautläsionen, insbesondere bei Entzündungen mit Extravasation, und/oder den Kiemen gefunden. In der Versuchsgruppe traten die *Trypanosoma* sp. auf der Haut bei 20% der Fische geringgradig und bei 10% mittelgradig auf. In den Kiemen waren bei 10% ein mittelgradiger Befall nachweisbar. Insgesamt wurden bei 40% der untersuchten Fische *Trypanosoma* sp. festgestellt

[0102] In der Kontrollgruppe wurden *Trypanosoma* sp. bei 7,1% der untersuchten Fische nachgewiesen, dabei sowohl in der Haut mit hochgradiger, als auch in den Kiemen mit geringgradiger Befallsintensität.

[0103] Hinsichtlich des Auftretens von *Trypanosoma* sp. zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe (Tab. 5b).

[0104] Tab. 5b: Parasitologische Untersuchung: Prävalenz der Fische mit Nachweis eines *Trypanosoma* sp.-Befall in Hautläsionen und Kiemen bis zum Tag 12 in der Versuchsgruppe (n = 10) und Kontrollgruppe (n = 14) sowie zusammenfassende Befundauswertung zum Gesamtbefund. Auftreten von keinem (Score 0), geringgradigem (Score I), mittelgradigem (Score II) und hochgradigem Befall (Score III).

Untersuchung	Haut		Kiemen		Gesamt- befund	
	Trypan.		Trypan.			
	VG	KG	VG	KG	VG	KG
0	6	13	9	13	6	13
I	3	0	0	1	2	0
II	1	0	1	0	2	0
III	0	1	0	0	0	1
$\chi^2$ -Hom.-Test	n.s.		n.s.		n.s.	

#### 1.1.4.3 Bakteriologische Untersuchung

[0105] Die Untersuchung von je einer Stichprobe (n = 5) der Versuchs- und Kontrollgruppe am Tag 12 erbrachte in beiden Gruppen den Nachweis eines gering- bis hochgradigen Befalls der Haut und eines gering- bis mittelgradigen Befalls der inneren Organe mit beweglichen Aeromonaden (*A. sobria*, *A. hydrophila*).

[0106] Myxobakterien konnten ebenfalls bakteriologisch diagnostiziert werden. Im Verlauf des Versuches wurden bei der Untersuchung von lebenden oder frischtoten Fischen der Kontroll- (n = 6) und Versuchsgruppe (n = 3) bei zwei Kontrollfischen die für Myxobakterien typischen Columnen und rasenbüschelartige Anordnung der beweglichen Stäbchenbakterien gefunden. Die Myxobakterien kamen am Tag 9 jeweils in hochgradiger Zahl auf der Haut (hochgradige Ulzera), sowie einmal in mittlerer Anzahl auf den Kiemen (hochgradige Kiemennekrose) vor. Bei den restlichen untersuchten Fischen der Kontrollgruppe (n = 4) und Versuchsgruppe (n = 3) wurden zwar überwiegend bewegliche Stäbchenbakterien in geringer Anzahl festgestellt, es fehlte jedoch immer die für Myxobakterien typische Anordnung.

#### 1.1.4.4 Mykologische Untersuchung

[0107] Die mykologische Untersuchung ergab bei beiden Fischgruppen den Nachweis von Pilzen der Gattung *Saprolegnia* sp.

#### 1.1.4.5 Nebenwirkungen und Beobachtungen bei der Behandlung

[0108] Im zweiten Behandlungsdrittel kam es während der Behandlung am sechsten Tag in Folge steigender Wassertemperaturen auf 21,1°C zu einer Absenkung der Sauerstoffkonzentration auf bis zu 3,9 mg/l bei einer Sauerstoffsättigung von 45%. Der Sauerstoffgrenzwert zur Erhaltung normaler Lebensbedingungen wird von ITAZAWA (1971) für Karpfen mit 4,2 mg/l und 47...49%iger Sättigung angegeben. Auch wenn Goldfischen allgemein ein geringerer Sauerstoffbedarf zugeschrieben wird (PENZES u. TÖLG, 1993), waren bei weiter steigenden Wassertemperaturen suboptimale Versuchsbedingungen nicht auszuschließen. Weiterhin war während des zweiten Versuchsabschnittes durch verstärkte Assimilation der Wasserpflanzen im Vorfluter ein Ansteigen des pH-Wertes auf bis zu 8,5 am siebenten Tag festzustellen. Durch Probemessungen des pH-Wert-Verlaufs während der Behandlungen wurden am siebenten und achten Tag nach der zweistündigen Expositionsdauer des Huminstoffes ein Absinken des pH um ca. einen Wert festgestellt. Dabei zeigten am achten Tag während der Behandlung zwei erkrankte Fische Gleichgewichtsstörungen. In der Versuchsgruppe kam es am Tag 8 während der Behandlung anscheinend zu Nebenwirkungen. Dort zeigten 2 Fische während der Behandlungsdauer Gleichgewichtsstörungen. Innerhalb kurzer Zeit verloren sie die Fähigkeit zur kontrollierten Körperhaltung, legten sich an der Wasseroberfläche auf die Seite und traten bei stark verlangsamter Atemfrequenz in den moribunden Zustand über. Die Fische wurden ordnungsgemäß getötet und untersucht. Der erste Fisch war hochgradig erkrankt. Er wies Ulzera auf der Körperseite bis zur Muskulatur und mittelgradig Randnekrosen in den Kiemen auf. Die parasitologische Untersuchung erbrachte auf der Haut den Nachweis eines hochgradigen *Trichodina* sp.- sowie eines geringgradigen *Chilodonella* sp.-, *Ichthyobodo* sp.- und *Gyrodactylus* sp.-Befalls. Der zweite Fisch besaß ein grau-olivgrünes hochgradig verpilztes Auge, Kiemen mit geringgradigen Hämorrhagien und schleimigen Belägen sowie mittelgradiger Kiemenrandnekrose. Parasitologisch wa-

ren hier auf der Haut mittelgradig *Trichodina* sp., geringgradig *Chilodonella* sp., *Ichthyobodo* sp., *Gyrodactylus* sp. und *Trypanosoma* sp. nachweisbar. Die Kiemen wiesen einen Massenbefall mit *Chilodonella* sp. und jeweils geringgradig *Trichodina* sp., *Ichthyobodo* sp. und *Dactylogyrus* sp. auf.

[0109] Bei einer durchgeführten gleichartigen Behandlung von weiteren 100 Goldfischen des Bestandes konnten auch nach 2,5 h keine negativen Wirkungen beobachtet werden. Allgemein konnte ein Effekt festgestellt werden, der als eine Art Beruhigung der Fische gedeutet werden kann. Nach dem Einfüllen der Behandlungslösung schwammen die Fische ruhig und verteilt in der Rinne. Eine anfängliche geringe Scheu und Neugier der Fische auf Grund der stark dunkelbraun färbenden Lösung verschwand schnell.

## 1.2 Huminsäure als Futterzusatz bei der Aufzucht von Nutzfischen

### 1.2.1 Feldversuch bei $K_{v-3}$ (Versuch I): Tiere, Material und Methoden

#### 1.2.1.1 Tiere

[0110] Die für die Versuche verwendeten Lausitzer Spiegelkarpfen aus einer Zuchtlinie wuchsen als  $K_0$  in Vorstreckteichen zu  $K_v$  ab. Nach dem vierwöchigen Vorstrecken wurden die  $K_v$  mit einem mittleren Stückgewicht von 0,6 g abgefischt.

[0111] Die  $K_v$  standen ohne Anzeichen von Erkrankungen oder erhöhte Verluste für die Versuche zur Verfügung.

[0112] Die  $K_v$  wurden abgefischt, gewogen und durch die Auszählung einer Stichprobe von 500 g das mittlere Stückgewicht von 0,6 g bestimmt. Danach wurde dem Bestand dem Gewicht entsprechend eine Menge von 14000  $K_v$  entnommen, die als zwei Gruppen zu jeweils 7000  $K_v$  zum Besatz der Versuchsteiche dienten. Die Besatzdichten betragen damit in der Versuchs- und Kontrollgruppe 35000  $K_v$ /ha.

#### 1.2.1.2 Material und Methoden

##### 1.2.1.2.1 Versuchsanlage

[0113] Der Versuch wurde in Versuchsteichen einer Satzfischanlage durchgeführt. Die künstlich angelegten Erdteiche besaßen eine Größe von je 0,2 ha und eine Tiefe von 1,5 m. Für die ertragreichen Teiche der Bonitätsklasse II wurde ein Naturertrag von 300 kg/ha angesetzt (BOHL u. RIEGGERT 1999, S. 341; SCHÄPER-CLAUS 1998, S. 253). Die Vorflut konnte gut geregelt werden. So wurde nach Bedarf (z. B. Verdunstung, hohe Temperaturen) Oberflächenwasser (Bach-Talsperren-Wasser) eingeleitet.

[0114] Nach drei Wachstumsperioden erfolgte die Hälterung im Spätherbst bis zum Winter in betonierten Rundbecken. Bei einem Innendurchmesser von 10 m und einer Wassertiefe von 2 m ergab sich ein Wasservolumen von ca. 150 m<sup>3</sup>. Das gesamte Wasservolumen erneuerte sich durch die Speisung mit Oberflächenwasser einmal am Tag.

##### 1.2.1.2.2 Umweltbedingungen

[0115] Die Wasseruntersuchungen wurden vor Ort und unmittelbar nach den Probenahmen durchgeführt.

[0116] Alle Messwerte lagen allgemein im physiologischen Bereich für Karpfen. Nur der Ammoniakgehalt befand sich unter spätsommerlichen Bedingungen (hohe Temperaturen, Algenblüte) in beiden Gruppen zeitweise außerhalb des Grenzwertes zur Vermeidung von Schädigungen.

[0117] Tab. 6: Versuch I: Wasserparameter in der Versuchs- und Kontrollgruppe. Wassertemperatur, Gehalt an Sauerstoff, Ammonium, Ammoniak, Nitrit, salpetriger Säure, Nitrat und pH-Wert, Säurebindungsvermögen. Die Messwerte liegen allgemein im physiologischen Bereich für Karpfen. Nur der Ammoniakgehalt befindet sich in beiden Gruppen zeitweise außerhalb des Grenzwertes zur Vermeidung von Schädigungen.

Wasserparameter	VG: Min....Max.	KG: Min....Max.
Temperatur (°C)	3,1...21,8	3,2...21,9
O <sub>2</sub> (mg/l)	4,5...11,8	4,3...12,4
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	0,7...1,0	0,7...1,1
NH <sub>3</sub> (mg/l), berechnet	0,005...0,18	0,006...0,18
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	0...0,6	0...0,6
HNO <sub>2</sub> (mg/l), berechnet	0...6*10 <sup>-6</sup>	0...4*10 <sup>-6</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	0,3...4,1	0,8...3,6
pH	7,5...8,9	7,6...8,9
SBV (mmol/l)	1,4...2,8	1,4...2,4

[0118] Ab dem zweiten Aufzuchtjahr wurden am Teich der Versuchsgruppe verstärkt Tritt- und Fraßspuren von Fischottern vorgefunden. Diese für die Auswertung des Zuwachses im zweiten und dritten Aufzuchtjahres ungünstige Situation war hervorgerufen worden einmal durch die randständige Lage des Versuchsteichs direkt am wasserzuführenden Graben (Talsperren-Oberflächen-Wasser) und außerdem durch die zunehmende Größe der Fische, die damit eine höhere Bedeutung als Beutetiere für Fischotter erlangten.

#### 1.2.1.2.3 Testsubstanz

[0119] Es wurde natürlicher Braunkohle-Huminstoff als Zusatz zum Futter überprüft. Die Einmischung des Präparates in das Futter erfolgte durch den Futtermittelhersteller während des Produktionsprozesses (Pelletierung).

#### 1.2.1.2.4 Futtermittel

[0120] Es wurde ein handelsübliches pelletiertes Alleinfuttermittel verwendet.

[0121] Das Futter für die Versuchsgruppe (Versuchsfutter) enthielt 5% natürlichen Braunkohlen-Huminstoff.

#### Futterzusammensetzung

[0122] Nach Angaben des Herstellers ist das Futter aus folgenden Ausgangsstoffen zusammengesetzt:

– Fischmehl; Weizengrießkleie; Fleischfuttermehl; Weizenflocken; Federmehl, hydrolysiert; Seetieröl für Fische; Griebenkuchen; Zuckerrübenmelasse; Sojaprotein-Konzentrat; Blutmehl; Vormischung Vitamine (Paribin®).

#### Futterinhaltsstoffe

[0123] Für beide Futter, ohne (Kontrollfutter) und mit Huminstoffzusatz (Versuchsfutter), werden vom Hersteller die gleichen Gehalte an den Inhaltsstoffen Rohprotein, Lysin, Rohfett, Rohfaser und Rohasche angegeben (s. Tab.: 7): Tab. 7: Futterinhaltsstoffe Versuchs- und Kontrollfutter Angaben des Gehaltes an Rohprotein, Lysin, Rohfett, Rohfaser und Rohasche in % der Originalsubstanz.

Inhaltsstoff	% in der Orig.-Substanz
Rohprotein	42,5
Lysin	2,5
Rohfett	13,0
Rohfaser	2,5
Rohasche	9,0

[0124] Die Rohprotein-Gehalte des Versuchs- und Kontrollfutters wurde am Institut für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig überprüft. Zur Untersuchung wurde das Gerät „Analysator Macro N“, Fa. Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Deutschland jeweils vor und nach den Messungen geeicht. Für das Versuchsfutter ergab sich der Rohproteingehalt von 43,50 in der Originalsubstanz bzw. 47,62% in der Trockensubstanz. Der Rohprotein-Gehalt des Kontrollfutters betrug 42,31% in der Originalsubstanz bzw. 46,27% in der Trockensubstanz. Zwischen den Futtern für die Versuchs- und Kontrollgruppe bestand nur ein geringer Unterschied. Das Kontrollfutter entsprach bei einer geringen Toleranz den Herstellerangaben. Beim Versuchsfutter ist zu vermuten, dass der Zumischung des Huminstoff-Präparates mit einer entsprechenden Proteinzulage begegnet wurde, welche den angegebenen Rohproteingehalt mit Sicherheit erreicht hat.

[0125] Tab. 7a: Futterinhaltsstoffe: Überprüfung des Versuchs- und Kontrollfutters nach dem DUMAS-Verfahren. Trockensubstanzen, Rohprotein-Gehalte in der Originalsubstanz und Trockensubstanz. Zwischen den Futtern bestehen nur geringe Unterschiede.

Inhaltsstoff nach DUMAS	Versuchsfutter		Kontrollfutter	
	% in der OS	% in der TS	% in der OS	% in der TS
Trockensub- stanz	91,35		91,44	
Rohprotein	43,50	47,62	42,31	46,27

Futterzusatzstoffe/kg Mischfutter

[0126] Vom Hersteller werden folgende Komponenten zugesetzt:

– 38000 I. E. Vitamin A; 2000 I. E. Vitamin D<sub>3</sub>; 100 mg Vitamin E (α-Tocopherolacetat); BHT; BHA; Propylgallat; Calciumpropionat.

#### 1.2.1.2.5 Fütterungsregime

[0127] Der Besatz der Versuchsteiche erfolgte, als die Wassertemperaturen 18°C erreicht hatten. Die Versuchsgruppe erhielt das Pelletfutter mit Huminstoffzusatz, die Kontrollgruppe das Pelletfutter ohne Huminstoffzusatz.

[0128] Die Fütterung erfolgte täglich per Hand, je nach Futterraufnahme mehrmals täglich, über einen Zeitraum von 87 Tagen. Auf Grund des wesentlich höheren Nahrungsbedarfs je Masseinheit heranwachsender Karpfen als größerer Karpfen wurde anfangs täglich 10 der Bestandsmasse an Pelletfutter gegeben (BOHL u. RIEGGER 1999, S. 404; MÜLLER 1986, S. 64; SCHUHMACHER u. GROPP 1999, S. 147). Täglich wurden die Aktivität der Fische an der Futterstelle sowie die Versuchsbedingungen an den Teichen überprüft. Lag noch Futter von der letzten Fütterung an der Futterstelle, wurde die Fütterung ausgesetzt. Der tägliche Futterverbrauch verminderte sich in der Wachstumsperiode allmählich auf 4...2% der Lebendmasse des Bestands und Tag in Abhängigkeit von der Wassertemperatur (MÜLLER 1986, S. 64). Orientierend an den Ausführungen von SCHÄPERCLAUS (1998) wurde als unterste Grenze für eine Gewichtszunahme 13...15°C angenommen. So war die erste Aufzuchtperiode nach 87 Tagen Pelletgabe bei 13°C Wassertemperatur beendet.

[0129] Im zweiten und dritten Aufzuchtjahr wurden in den Wachstumsperioden das gleiche Pelletfutter in

Höhe von 2...4% der Fischmasse verabreicht. Zur Überwinterung blieben die Fische in den Versuchsteichen stehen (Zatorer Methode). Nur nach der dritten Aufzuchtperiode wurden beide Fischgruppen in die Winterhalterungsanlagen (Betonbekken) verbracht. In der Haltung wurden die Fische noch 100 Tage mit den Versuchsfuttern versorgt. Hier wurde auf Grund der niedrigen Temperaturen vorrangig der Erhaltungsbedarf in beiden Gruppen mit einer Pelletfüttergabe in der Höhe von ca. 0,5% der Fischmasse gedeckt und bei Futterverweigerung ausgesetzt. Die Versuchsfütterung wurde im Winter, nach insgesamt 900 Versuchstagen und wiederum 100 Tage vor dem Versuchsende, bei den verkaufsfähigen  $K_3$  eingestellt.

[0130] Für die Fütterung des Versuchsfutters mit dem Zusatz von 5% Huminstoff ist zu beachten, dass es sich bei den Versuchsteichen um ertragreiche Teiche mit natürlich vorhandenen Nahrungsressourcen handelt. Aus dem zusätzlichen Anteil der Naturnahrung an der Gesamtnahrung ergibt sich ein Huminstoffanteil von nur maximal 5% an der Gesamtnahrung, d. h. der relative Anteil des im Pelletfuttermittels enthaltenen Huminstoffs an der Gesamtnahrung liegt durch die Verdünnung mit der Aufnahme im Teich vorhandener Nahrungsressourcen für gewöhnlich unter 5%.

#### 1.2.1.2.6 Untersuchungen

[0131] Es sollte die Langzeitwirkung des mit 5% in einer therapeutischen Dosierung verwendeten HS-Präparat-Zusatzes zum Pelletfuttermittel in ertragreichen Teichen mit einem Naturnahrungsanteil bei einem Erstbesatz von 35000  $K_v$ /ha über drei Wachstumsperioden überprüft werden.

[0132] Dazu wurden während der ersten Aufzuchtperiode und am Ende jeder der drei Aufzuchtperioden von  $K_v-3$  stichprobenweise Gesundheitskontrollen durchgeführt. Diese Kontrollen beinhalteten eine pathologisch-anatomische, parasitologische sowie ggf. histologische, bakteriologische, mykologische und virologische Untersuchung.

[0133] Der bakterielle Befall wurde semiquantitativ durch das Auszählen der koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt. Bis zu 30 KBE wurden einem geringgradigen, bis zu 100 KBE einem mittelgradigen und mehr als 100 KBE einem hochgradigen Befall zugeordnet.

[0134] Der Zuwachs der Fischgruppen wurde durch eine komplette Abfischung bestimmt. Aus den sich Zuwachsen der Bestandsmasse und den aufgewendeten Futtermengen ergaben sich die relativen Futterquotienten für die entsprechenden Aufzuchtperioden (BOHL u. RIEGGERT 1999, S. 378). Im ersten Aufzuchtjahr wird die eingesetzte Bestandsmasse an (vorgestreckter) Karpfenbrut vernachlässigt. Gleichzeitig wurden bei den Abfischungen und Stichproben-Untersuchungen die Anzahl der Fische und daraus die mittleren Stückmassen bestimmt.

#### 1.2.1.2.7 Statistische Methoden

[0135] Die Berechnung des Unterschieds im bakteriellen Befall nach einer Aufzuchtperiode, in den Verlusten und der Vergleich der Gesamtmassen erfolgte gemeinsam mit den Ergebnissen der Untersuchungen des Versuchs II.

### 1.2.2 Feldversuch bei $K_{0,1}$ in drei Besatzvarianten (Versuch II): Tiere, Material und Methoden

#### 1.2.2.1 Tiere

[0136] Die für die Versuche verwendeten Spiegelkarpfen einer Zuchtlinie wurden künstlich erbrütet. Nach 2 Tagen standen die schwimm- und fressfähigen Larven für die Versuche zur Verfügung.

[0137] Die  $K_0$  besaßen keine Anzeichen von Erkrankungen, erhöhten Verlusten oder Anomalien.

[0138] Durch das Auszählen der  $K_0$  je Volumeneinheit in den entnommenen Mischproben und der Berechnung des nötigen Volumens  $K_0$ -Wasser-Gemisch nach MÜLLER (1986) wurden die notwendigen Mengen für jeweils eine Versuchs- und Kontrollgruppe von je 5000 (VG1/KG1), 7500 (VG2/KG2) und 10000  $K_0$  (VG3/KG3) bereitgestellt. Die Gruppen der  $K_0$  wurden anschließend in die Aufzuchtteiche verbracht. Die Besatzdichten betragen damit für die jeweilige Versuchs- und Kontrollgruppen 20000, 30000 und 40000  $K_0$ /ha .

[0139] Tab. 8: Versuch II: Besatzintensität in den Versuchs- und Kontrollgruppen 1...3 je Versuchsteich sowie je ha.

Gruppe	Besatz K <sub>0</sub> / Versuchsteich	Besatz K <sub>0</sub> / ha
VG 1, KG 1	5000	20000
VG 2, KG 2	7500	30000
VG 3, KG 3	10000	40000

#### 1.2.2.2 Material und Methoden

##### 1.2.2.2.1 Versuchsanlage

[0140] Der Versuch wurde einer Versuchsteichanlage durchgeführt. Die künstlich angelegten Erdteiche besaßen eine Größe von je 0,25 ha und eine Tiefe von 1,5 m. Für die ertragreichen Teiche der Bonitätsklasse II wurde ein Naturertrag von 300 kg/ha angesetzt (BOHL u. RIEGGERT 1999, S. 341; SCHÄPERCLAUS 1998, S. 253). Die Vorflut konnte gut geregelt werden. So wurde nach Bedarf (z. B. Verdunstung, hohe Temperaturen) Oberflächenwasser eingeleitet.

##### 1.2.2.2.2 Umweltbedingungen

[0141] Für die Absicherung einer ausreichenden Wasserqualität wurden in allen Gruppen Wasserproben regelmäßig und unmittelbar nach der Probenahme untersucht.

##### 1.2.2.2.3 Testsubstanz

[0142] Es wurde natürlicher Braunkohle-Huminstoff als Zusatz zum Futter überprüft. Die Einmischung des Präparates in das Futter erfolgte durch den Futtermittelhersteller während des Produktionsprozesses (Pelletierung).

##### 1.2.2.2.4 Futtermittel

[0143] Es wurde ein handelsübliches pelletiertes Alleinfuttermittel für Karpfen verwendet. Dem Futter für die Versuchsgruppen (Versuchsfutter) waren 5% natürlicher Braunkohle-Huminstoff zugesetzt worden.

#### Futterzusammensetzung

[0144] Nach Angaben des Herstellers ist das Futter aus folgenden Ausgangsstoffen zusammengesetzt:  
– Ölextraktionsschrote; Nebenerzeugnisse der Getreideverarbeitung; Fleischmehl; Fischerzeugnisse; Melasse; Mineralstoffe.

#### Futterinhaltsstoffe

[0145] Für das Futter werden vom Hersteller bezogen auf die Originalsubstanz 30,0% Rohprotein, 10,0% Rohfett, 6,4% Rohfaser und 8,4% Rohasche angegeben (s. Tab. 9). Für die Herstellung des Futters der Versuchsgruppe (Versuchsfutter) blieben die Ausgangsstoffe bis auf die Zumischung von 5% des Huminstoffpräparats im Verhältnis unverändert. Daraus ergibt sich eine geringe Reduzierung (5%) an den Nährstoffen im Versuchsfutter. Das entspricht einem Gehalt von 28,5% Rohprotein und 9,5% Rohfett bezogen auf die Originalsubstanz.

Tab.9: Futterinhaltsstoffe

Inhaltsstoff	% in der Orig.-Substanz
Rohprotein	30,0
Rohfett	10,0
Rohfaser	6,4
Rohasche	8,4

Futterzusatzstoffe/kg Mischfutter

[0146] Vom Hersteller werden folgende Komponenten zugesetzt:  
20000 I. E. Vitamin A; 2000 I. E. Vitamin D<sub>3</sub>; 100 mg Vitamin E; 5 mg Kupfer; Inositol; BHA/Ethoxyquin.

#### 1.2.2.2.5 Fütterungsregime

[0147] Analog zum Versuch I erfolgte der Besatz der Versuchsteiche, als die Wassertemperaturen 18°C erreicht hatten. Die Versuchsgruppe erhielt das Pelletfutter mit Huminstoffzusatz, die Kontrollgruppe das Pelletfutter ohne Huminstoffzusatz.

[0148] Anfangs wurde der Nahrungsbedarf durch die in den Teichen vorhandene Naturnahrung gedeckt. Am Ende der zweiten Woche wurde zusätzlich Weizenschrot angeboten. Diese Futtergabe besaß insgesamt einen Anteil von 9,9% (VG1, KG1), 12,0% (VG2, KG2) und 14,2% (VG3, KG3) an der Gesamtfuttermenge. Die höheren Anteile bei den VG2/KG2 und mehr noch bei den VG3/KG3 gegenüber den VG1/KG1 ergibt sich aus den höheren Besatzdichten und der daraus resultierenden geringeren relativen Anteile an Naturnahrung pro Fischbesatz. Die Pelletfütterung erfolgte ab dem 63. Versuchstag über Futterautomaten und analog zum Versuch I über einen Zeitraum von 87 Tagen, bis die Wassertemperatur 13°C erreichte. Nähere Angaben hierzu (Fütterungsintensität des Pelletfutters etc.) sind den Ausführungen zur ersten Aufzuchtperiode des Versuchs I zu entnehmen.

[0149] Wie im Versuch I ist für die Fütterung des Versuchsfutters mit dem Zusatz von 5% HS-Präparat zu beachten, dass es sich bei den Versuchsteichen um ertragreiche Teiche mit natürlich vorhandenen Nahrungsressourcen handelt. Aus dem zusätzlichen Anteil der Naturnahrung an der Gesamtnahrung ergibt sich ein HS-Präparat-Anteil von nur maximal 5% an der Gesamtnahrung, d. h. der relative Anteil des im Pelletfuttermittels enthaltenen HS-Präparats an der Gesamtnahrung liegt durch die Verdünnung mit der Aufnahme im Teich vorhandener Nahrungsressourcen für gewöhnlich unter 5%.

#### 1.2.2.2.6 Untersuchungen

[0150] Nachdem sich in der ersten Aufzuchtperiode des Versuchs I bei einem Kv-Besatz von 35000/ha positive Effekte auf die Körpermassen-Entwicklung ergaben, sollte der Einfluss der Besatzintensität in Höhe von 20000, 30000 und 40000 K<sub>0</sub>/ha bei der Aufzucht von K<sub>1</sub> überprüft werden.

[0151] Analog zur ersten Aufzuchtperiode des Versuchs I wurden während (je n = 5...10) und am Ende (je n = 6) der Aufzuchtperiode in jeder Gruppe stichprobenweise Gesundheitskontrollen durchgeführt. Diese Kontrollen beinhalteten gleichfalls pathologisch-anatomische und parasitologische Untersuchungen im Labor des Sächsischen Fischgesundheitsdienstes sowie abschließend eine histologische, bakteriologische und virologische Untersuchung.

[0152] Insgesamt erfolgte die Bestimmung der Leistungsparameter (Zuwachs der Fischgruppen, Stückzahlen, mittlere Stückgewichte, relative Futterquotienten) analog zum Versuch I.

#### 1.2.2.2.7 Statistische Methoden

[0153] Für die Untersuchung des Unterschieds im bakteriellen Befall diente der Rangsummentest von White (KRAUSE u. METZLER 1988, S. 158). Der bakterielle Befall der einzelnen Fische der Stichproben wurde nach dem Grad beurteilt, s. Tab. 10:

Tab. 10: Bakterielle Untersuchung. Einordnung der Untersuchungsergebnisse der Stichproben-Untersuchung in den Befallsgrad als Grundlage für die statistische Auswertung mit dem Rangsummentest von White.

Untersuchungsergebnis	Grad des Befalls
kein Organ befallen	0
mindestens ein Organ geringgradig befallen	1
mindestens ein Organ mittelgradig befallen	2
mindestens ein Organ hochgradig befallen	3

## 1.2.3 Forellenaufzucht in Aquarien (Versuch III): Tiere, Material und Methoden

## 1.2.3.1 Tiere

[0154] In einer Fischzucht wurde Regenbogenforellenlaich ( $Rf_E$ ) der Zuchtlinie eines irischen Fischhaltungsbetriebs ohne erhöhte Verluste erbrütet. Da die  $Rf_E$  aus einem nach der Richtlinie 91/67/EWG zugelassenen Gebiet (FISCHSEUCHEN-VERORDNUNG 2001) stammten, konnte davon ausgegangen werden, dass die Fische keine Träger des Virus der Viralen hämorrhagischen Septikämie der Salmoniden (VHS) und der Infektiösen hämatopoetischen Nekrose der Salmoniden (IHN) waren. Zu Beginn der Aufzuchtphase stellten sich bei einem geringen Prozentsatz der Regenbogenforellen-Brütlinge Symptome der Infektiösen Pankreasnekrose der Salmoniden (IPN) mit Dunkelverfärbung, Exophthalmus und Auftreibungen des Vorderleibs ein (ROBERTS u. SCHLOTFELD 1985, S. 129). Die virologische Untersuchung erbrachte jedoch keinen Nachweis von Viren der Salmoniden. Die für die Versuche nach dem Prinzip der zufälligen Auswahl entnommenen freischwimmenden, fressfähigen Regenbogenforellenbrütlinge ( $Rf_0$ ) mit einem mittleren Gewicht von 0,13 g wurden 6 Wochen im Aquarium analog der folgenden Versuchsbedingungen aufgezogen und beobachtet. Sie erhielten ein handelsübliches Brutaufzuchtfutter mit einem hohen Gehalt an Protein ( $R_p = 55\%$ ) und Fett ( $R_{fe} = 20\%$ ). Während dieser Aufzuchtphase von  $Rf_{0,v}$ , die gleichzeitig zur Adaptation an höhere Wassertemperaturen diente, wurden keine Erkrankungen oder Verluste festgestellt.

[0155] Zu Versuchsbeginn wies die vorgestreckte Brut ( $Rf_v$ ) eine Körperlänge von 4...5 cm bei einer mittleren Körpermasse von 0,92 g auf. Eine Stichprobe ( $n = 5$ ) wurde pathologisch-anatomisch und parasitologisch untersucht. Die Tiere waren frei von Krankheitsanzeichen.

[0156] Aus 50 Forellensetzlingen wurden nach dem Zufallsprinzip eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe zu je 25 Probanden gebildet. Die Wägung (Sartorius, Typ BP 610, Fa. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) ergab gleiche mittlere Körpermassen in den Gruppen von 0,92 g.

[0157] Der Versuchsabschnitt 1 beinhaltete die Aufzuchtphase bis zu einer mittleren Stückmasse von 3 g. Das mittlere Zielgewicht des Versuchsabschnitts 2 betrug 10 g. Der dritte und letzte Versuchsabschnitt wurde bis zum mittleren Ziel-Endgewicht von mindestens 30 g geführt. Um während der gesamten Versuchszeit den Anforderungen an die Umweltfaktoren gerecht zu werden, wurden mit der wachsenden Bestandsmasse nach jeder der drei Aufzuchtphasen, bzw. in der ersten Aufzuchtphase zwei mal aufgrund von erhöhtem Aufkommen an Ammonium/Ammoniak in der Versuchsgruppe, mit dem Erreichen des Zielgewichtes jeweils die gleiche Anzahl von Fischen in der Weise entnommen, dass der folgende Besatz der Aquarien wieder mit einer gleich hohen Fischmasse erfolgte.

[0158] Tab. 11: Gliederung des Versuchs I: Versuchsplan über die drei Aufzuchtphasen mit den mittleren Zielgewichten in den Gruppen.

Versuchsabschnitt	mittlere Zielgewichte (g)
1	3
2	10
3	30

## 1.2.3.2 Material und Methoden

## 1.2.3.2.1 Versuchsanlage

[0159] Die Fische wurden in zwei Aquarien mit 80 l Wasservolumen bei einer Länge von 70 cm sowie einer Breite und Höhe von je 35 cm untergebracht. Zur Belüftung diente eine handelsübliche Aquarien-Membranpumpe, die über einen an der Wandung angebrachten Luftausströmer (Plastik-Flies) für eine kontinuierliche Wasserumwälzung und kräftige Belüftung sorgte. Die Positionierung der Aquarien im Raum sicherte eine gleichmäßige Ausleuchtung mit Tageslicht.

## 1.2.3.2.2 Umweltbedingungen

[0160] Die Wasseruntersuchungen wurden mit dem Aquamerck® Kompaktlabor für Wasseruntersuchungen durchgeführt.

[0161] Auf Grund der Unterbringung der Aquarien in einem nicht temperierten Raum folgte die Wassertemperatur in gemäßigter Form der jahreszeitlichen Änderung (Sommer/Winter) der Außentemperatur. Die Bestimmung der Parameter der Stickstoffreihe erfolgte in jedem Versuchsabschnitt, vor dem Wasserwechsel und unmittelbar nach der Probenahme. Der in Bezug auf die fischtoxischen Eigenschaften relevante Ammoniakgehalt wurde nach der Gleichung von HOFER u. LACKNER (1995, S. 58) und der Gehalt an salpetriger Säure nach WEDEMEYER und YASUTAKE (1978) sowie SCHRECKENBACH und SPANGENBERG (1983) bestimmt. Die regelmäßige teilweise Wassererneuerung durch Leitungswasser wurde in beiden Gruppen in jeweils gleicher Menge so gestaltet, dass sich die Gehalte an Ammoniak und salpetriger Säure unterhalb bzw. nur kurze Zeit in den Grenzbereichen zur Vermeidung von Schädigungen (SCHÄPERCLAUS 1990, S. 839 u. 844) befanden. Allgemein lagen alle bestimmten Wasserparameter im physiologischen Bereich (SCHÄPERCLAUS 1990, SCHÄPERCLAUS 1998, S. 456). Eine Übersicht über die Wasserparameter zeigt die Tabelle X; die Parameter in den einzelnen Versuchsabschnitten sind dem Anhang, Tab. 2 und 3 zu entnehmen. Der Ammoniakgehalt lag mit 0,012 mg/l in der Versuchsgruppe zu Beginn des ersten Versuchsabschnitts über dem Qualitätsziel zur Vermeidung von Schädigungen von 0,006 mg/l (SCHÄPERERCLAUS 1990, S. 844), nicht jedoch im toxischen Bereich (HOFER u. LACKNER 1995, S. 66) und hatte keine erkennbaren Auswirkungen auf das Verhalten oder den Gesundheitszustand. Den Versuchsbedingungen Rechnung tragend, wurde der anfangs im Drei-Tage-Rhythmus vorgenommene Teilwasserwechsel nachfolgend täglich durchgeführt.

[0162] Der Kot wurde mit einem Schlauch bei den Teilwasserwechseln vorsichtig vom Aquarienboden abgesaugt. Weitere Reinigungsarbeiten erfolgten nicht.

[0163] Die allgemeinen Versuchsbedingungen wurden täglich kontrolliert.

[0164] Tab. 12: Wasserparameter im Versuch III: Die Wassertemperatur, die Gehalte an Sauerstoff, Ammonium, Ammoniak, Nitrit, salpetriger Säure, Nitrat, der pH-Wert, das Säurebindungsvermögen und die Gesamthärte lagen allgemein in der Versuchs- und Kontrollgruppe im physiologischen Bereich für Regenbogenforellen. Der Ammoniakgehalt liegt zu Beginn in der Versuchsgruppe über dem Qualitätsziel von 0,006 mg/l, jedoch nicht im toxischen Bereich.

Wasserparameter	VG: Min....Max.	KG: Min....Max.
Temperatur(°C)	6...22	6...22
O <sub>2</sub> (mg/l)	6,0...11,0	6,0...11,0
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	0,1...1,0	0,1...0,3
NH <sub>3</sub> (mg/l), berechnet	0,0001...0,012	0,0001...0,003
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	0,05...0,6	0,075...1,0
HNO <sub>2</sub> (mg/l), berechnet	0,00002...0,0002	0,00002...0,0002
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	40...60	60...90
pH	7...7,5	7...7,5
KH (mmol/l)	4,0...4,1	4,0...4,1
GH (mmol/l)	3,3...3,5	3,3...3,5

1.2.3.2.3 Testsubstanz (analog Versuch I)

1.2.3.2.4 Futtermittel (analog Versuch I)

1.2.3.2.5 Fütterungsregime

[0165] Während des 166 Tage dauernden Versuchs wurden beide Gruppen mindestens drei mal täglich in gleicher Höhe mit einer abgewogenen Menge an Futter versorgt. Die Fütterungsintensität richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers und den Angaben von SCHÄPERCLAUS (1998, S. 439). Sie bewegte sich allgemein zwischen 1,5...6,0% der Bestandmasse/Tag, so dass die Fütterung der Wassertemperatur und der Fischgröße entsprechend angepasst war. Nachdem im Versuchsabschnitt 1.a erhöhte Ammonium-/Ammoniakgehalte in der Versuchsgruppe auftraten (keine biologische und mechanische Filterung, kein Bodengrund), wurde die Fütterung in beiden Gruppen bei steigenden Wassertemperaturen bis zur Einstellung eines ausreichenden Ammoniumabbaus am Ende des Versuchsabschnittes 1.a restriktiv auf 1,0% der Bestandmasse/Tag gehalten.

[0166] Anfangs wurden die Futterpellets in der Korngröße von 2,5 mm soweit zerkleinert, dass die Fische das Futter problemlos aufnehmen konnten.

[0167] Im Gegensatz zu den Versuchen I und II war der 5 %ige HS-Präparat-Anteil des Pelletfutters identisch mit dem Anteil an der Gesamtnahrung, da in den Aquarien kein weiteres Nahrungsangebot vorhanden war. So wurden über das Versuchsfutter durchweg 5% HS-Präparat aufgenommen.

1.2.3.2.6 Untersuchungen

[0168] Es sollte die Langzeitwirkung des mit 5% in einer therapeutischen Dosierung verwendeten HS-Präparat-Zusatzes durch eine tägliche symptomatische Gesundheitskontrolle und eine pathomorphologische und parasitologische Untersuchung zum Abschluss eines jeden Versuchsabschnittes überprüft werden. Zu diesen Untersuchungen standen jeweils die zur Bestandsreduzierung entnommenen Fische und zum Versuchsabschluss alle verbliebenen Fische beider Gruppen zur Verfügung.

[0169] Gleichzeitig wurde zu Ende eines jeden Versuchsabschnittes vor den Bestandsreduzierungen, im ersten Versuchsabschnitt zwei mal, die Körpermassen-Entwicklung durch Einzelwägungen bestimmt (Sartorius, Typ BP 610, Fa. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Sie diente am Versuchsende unter der Einbeziehung des verbrauchten Futters zur Bestimmung des Futteraufwands (STEFFENS 1995, S. 49).

[0170] Weiterhin sollte untersucht werden, ob der HS-Futterzusatz ein spezifisches Milieu im Aquarium erzeugen kann, bei dem gegenüber der Kontrollgruppe unterschiedliche Voraussetzungen für das Wachstum eines Biofilms entstehen. Biofilme werden u. a. beeinflusst von der Verfügbarkeit von Nährstoffen für das Bakterienwachstum, der Anwesenheit bakterizider Stoffe und der Konzentration gelösten organischen Materials (BOVENDEUR 1989). Dazu wurde die Entstehung eines Biofilms bzw. Bewuchses an den Aquarienböden und -wänden dokumentiert. In der 20. Versuchswoche (138. Tag) wurden Proben der Biofilme mit einem Skalpell entnommen und mikroskopisch an der Landesuntersuchungsanstalt Sachsen sowie am Fachgebiet Fischkunde und Fischkrankheiten des Instituts für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig untersucht. Außerdem wurden vor dem Versuchsende jeweils 2 ml der Beläge 5 min bei  $6000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$  zentrifugiert. Der erhaltene Bodensatz von ca. 1 ml diente aufgeschüttelt zur Anfertigung von Ausstrichpräparaten, die nach GRAM und ZIEHL-NEELSEN gefärbt wurden. Zur bakteriologischen Untersuchung der Bodensätze kamen Blutagar-Böden, Wasserblau-Metachromgelb-Agar nach Gassner sowie Brilliantgrün-Phenolrot-Agar zum Einsatz. Die Bebrütung erfolgte bei  $25^\circ\text{C}$ .

1.2.3.2.7 Statistische Methoden

[0171] Die Körpermassenentwicklung der Versuchs- und Kontrollgruppe wurde nach jeder Wägung mit Hilfe des T-Tests auf Unterschiede überprüft.

1.2.4 Feldversuch bei  $K_{v-3}$  (Versuch I): Ergebnisse

1.2.4.1 Bakteriologische Untersuchung

[0172] Nach Abschluss des ersten Aufzuchtjahres erbrachte die bakteriologische Stichproben-Untersuchung (je  $n = 6$ ) der inneren Organe Leber, Niere und Milz in der Versuchsgruppe Keimfreiheit. Dagegen wurde in der Kontrollgruppe in 2 Fällen ein geringgradiger und in einem Fall ein hochgradiger bakterieller Befall der Milz festgestellt. Durch die Anzüchtung wurde *Aeromonas sobria* in Mischkultur mit *Pseudomonas putrefaciens* nachgewiesen. Erwähnt werden kann weiterhin, dass in 4 benachbarten Teichen mit  $K_1$ -Besatz die Infektionsraten

der untersuchten Stichproben (je n = 6) mit *Aeromonas*- und *Pseudomonas* sp. einmal bei 67% und dreimal bei 100% lagen. Die Befallsintensitäten waren hier geringgradig, gering- bis mittelgradig, mittel- bis hochgradig und hochgradig (s. Tab. X).

[0173] Die Angaben zum Befall mit Myxobakterien sind im vorhergehenden Gliederungspunkt im Zusammenhang mit den pathomorphologischen Veränderungen aufgeführt.

[0174] Tab.: 13: Bakteriologische Untersuchung von Stichproben (je n = 6) nach der ersten Aufzuchtperiode. In der Versuchsgruppe war kein bakterieller Befall vorhanden. In der Kontrollgruppe betrug die Infektionsrate 40% mit einer gering- bis hochgradigen Befallsintensität.

Fisch	Versuchsgruppe			Kontrollgruppe		
	Leber	Niere	Milz	Leber	Niere	Milz
1	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.
2	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.
3	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	ggr.
4	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	ggr.
5	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.
6	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	hgr.

[0175] Die nach der dritten Aufzuchtperiode, am 983. Versuchstag und 83 Tage nach der Beendigung der Versuchsfütterung für die bakteriologische Untersuchung der inneren Organe Leber, Niere und Milz entnommenen Fische beider Gruppen (je n = 10) besaßen in der Versuchsgruppe eine Infektionsrate von 60%, in der Kontrollgruppe von 40%. Die Befallsintensität war in beiden Gruppen gering- bis hochgradig (s. Tab. X). Durch die Differenzierung der Keime wurden in der Versuchs- und Kontrollgruppe *Aeromonas sobria* in Mischkultur mit *Pseudomonas* sp. und nicht näher differenzierbare *Aeromonas* sp. nachgewiesen.

[0176] Tab.: 14: Bakteriologische Untersuchung von Stichproben (je n = 10) nach der dritten Aufzuchtperiode, 83 Tage nach Beendigung der Versuchsfütterung. In der Versuchsgruppe betrug die Infektionsrate 60%, in der Kontrollgruppe 40%. Die Befallsintensität war in beiden Gruppen gering- bis hochgradig.

Fisch	Versuchsgruppe			Kontrollgruppe		
	Leber	Niere	Milz	Leber	Niere	Milz
1	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.
2	ggr.	mgr.	hgr.	ggr.	k. B.	k. B.
3	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	ggr.
4	k. B.	k. B.	k. B.	hgr.	mgr.	k. B.
5	ggr.	k. B.	ggr.	ggr.	k. B.	ggr.
6	k. B.	k. B.	ggr.	k. B.	k. B.	k. B.
7	ggr.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.
8	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.
9	k. B.	k. B.	ggr.	k. B.	k. B.	k. B.
10	ggr.	ggr.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.

1.2.4.2 Wachstum

Bestandsentwicklung, Verlustgeschehen, Zuwachs und Futteraufwand

Erste Aufzuchtperiode

[0177] Nach der ersten Aufzuchtperiode wurden in der Versuchsgruppe 1061  $K_1$  mit einem Gesamtgewicht von 86 kg abgefischt. Daraus ergibt sich eine mittlere Stückmasse von 81 g. Die Verluste betragen 5939 Stück, entsprechend 84,8 %. In der Kontrollgruppe wurden 1090  $K_1$  mit einem Gesamtgewicht von 59 kg abgefischt. Das mittlere Stückgewicht betrug 54 g. Die Verluste lagen bei 5904 Stück, entsprechend 84,3%. Da mit der täglichen Beobachtung keine verendeten Fische auffällig wurden, ist in beiden Gruppen von einem Verlustgeschehen in einer frühen Entwicklungsphase auszugehen. In der VG ergibt sich bei einem Zuwachs von 86 kg und einem Futtermittelverbrauch von 135 kg ein relativer Futterquotient von 1,57. In der Kontrollgruppe betrug der Zuwachs 59 kg, der Futtermittelverbrauch 132,5 kg, woraus ein relativer Futterquotient von 2,25 resultiert.

Zweite Aufzuchtperiode

[0178] Die Abfischung nach der zweiten Aufzuchtperiode ergab in der VG 3815 Stück  $K_2$ , eine Bestandsmasse von 267 kg, eine mittlere Stückmasse von 350 g sowie 292 Stück Verluste (27,7%). Die Kontrollgruppe wies 1090 Stück  $K_2$ , ein Gesamtgewicht von 295 kg, ein mittleres Stückgewicht von 340 g und Verluste in Höhe von 223 Stück (20,5%) auf. Der Zuwachs betrug in der VG 186 kg, so dass sich bei einem Futtermittelverbrauch von 450 ein relativer Futterquotient von 2,42 ergab. In der KG war ein Zuwachs von 236 kg und damit bei einem Futtermittelverbrauch von 455 kg ein relativer Futterquotient von 1,93 zu verzeichnen.

Dritte Aufzuchtperiode

[0179] Nach der dritten Aufzuchtperiode wurden in der VG 468 Stück  $K_3$  mit einem Gesamtgewicht von 440 kg abgefischt. Die mittlere Stückmasse betrug 962 g, die Verluste 295 Stück (38,7%). Bei einem Zuwachs von 183 kg und einem Futtermittelverbrauch ergibt sich ein relativer Futterquotient von 4,83. In der KG wurden 840 Stück  $K_3$  mit einem Gesamtgewicht von 630 kg und einem mittleren Stückgewicht von 750 g abgefischt. Verluste wurden in der Höhe von 27 Stück (3,1%) festgestellt. Aus dem Zuwachs von 335 kg und dem Futtermittelverbrauch von 852 kg resultiert ein relativer Futterquotient von 2,54.

Abschließende Winterhälterung

[0180] Die Abfischung aus der Winterhälterung ergab in der VG 458 Stück  $K_3$  mit einem Gesamtgewicht von 525 kg, eine mittlere Stückmasse von 1146 g. In der KG wurden 830 Stück  $K_3$  mit einem Gesamtgewicht von 710 kg und einer mittleren Stückmasse von 855 g abgefischt. In beiden Gruppen traten keine Verluste auf. Bei gleicher Fütterungsintensität war in der VG ein Zuwachs von 17,0% und in der KG von 12,9% bezogen auf das Ausgangsgewicht zu verzeichnen.

[0181] Tab. 15: Versuch I: Besatz und Abfischungsergebnisse in drei Aufzuchtperioden sowie der abschließenden Winterhälterung. Besatz [Stück/ha], Besatz [Stück/Versuchsteich bzw. Hälterbecken], Besatzmasse [kg], Abfischung [Stück/ha], Abfischung [Stück/Versuchsteich bzw. Hälterbecken], Abfischung [kg], mittlere Stückmasse [g], Verluste [Stück], Verluste [%], Futtermittelverbrauch [kg] sowie relativer Futterquotient aus Futtermittelverbrauch und Zuwachs an Bestandsmasse.

	K <sub>1</sub> -Aufzucht		K <sub>2</sub> -Aufzucht		K <sub>3</sub> -Aufzucht		Winterhälterg.	
	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG
Besatz [Stück/ha]	35000	35000	5275	5450	3815	4335	-	-
Besatz [Stück/VT]	7000	7000	1055	1090	763	867	458	830
Besatz [kg]	4,2	4,2	85	59	267	295	440	622
Abfischg. [Stück/ha]	5305	5480	3815	4335	2340	4200	-	-
Abfischg. [Stück/VT]	1061	1096	763	867	468	840	458	830
Abfischung [kg]	86	59	267	295	450	630	525	710
mittl. Stückmasse [g]	81	54	350	340	962	750	1146	855
Verluste [Stück]	5939	5904	292	223	295	27	0	0
Verluste [%]	84,8	84,3	27,7	20,5	38,7	3,1	0	0
Zuwachs [kg]	86	59	186	236	183	335	75	80
Futtermverbrauch [kg]	135	132,5	450	455	884	852	-	-
relativ. Futterquotient	1,57	2,25	2,42	1,93	4,83	2,54	-	-

Mittlere Körpermassen im Versuchsverlauf

[0182] Die Untersuchung der mittleren Körpermassen in den Gruppen unter zu Hilfenahme der Stichproben-Untersuchungen und der Abfischungsergebnisse nach den drei Aufzuchtperioden ergab ab dem 50. Versuchstag höhere mittlere Körpermassen der Fische der Versuchsgruppe. Dieser Unterschied wurde bei den 3 Abfischungsergebnissen und bei 5 Stichproben-Untersuchungen deutlich ( $p < 0,05 \dots 0,0001$ ). Bei der 6. Stichproben-Untersuchung vor der Endabfischung am 983. Versuchstag ist der Unterschied nicht signifikant, was auf die zu geringe Fallzahl zurückzuführen ist, da für alle anderen Zeitpunkte in diesem Zeitraum der Unterschied signifikant ist. Die relative Standardabweichung dieser Stichproben-Untersuchung wurde für die Berechnung der Unterschiede zu den anderen Zeitpunkten übernommen.

[0183] Die mittleren Körpermassen der Versuchs- und Kontrollfische aus den Stichproben-Untersuchungen und Bestandsbegutachtung sind der Tabelle 16 zu entnehmen.

[0184] Tab. 16: Entwicklung der Körpermassen im Versuch I: Mittlere Körpermassen in der Versuchs- und Kontrollgruppe zu den entsprechenden Untersuchungszeitpunkten der Stichproben und Bestandsbegutachtungen (grau unterlegt). Bis auf die Stichprobennahme am 983. Versuchstag (je  $n = 10$ ) ist der Unterschied ab dem 50. Versuchstag signifikant bis hoch signifikant mit  $p < 0,05 \dots 0,0001$  (t-Test von White).

Versuchstag	Versuchsgruppe		Kontrollgruppe		Unterschied (t-Test)
	mittl. Stckm.	N	mittl. Stckm.	N	
1	0,6	7000	0,6	7000	nicht sign.
50	33	58	19	37	p<0,0001
60	41	34	34	35	p<0,005
114	65	17	45	20	p<0,05
259/260	81	1061	54	1096	p<0,0001
373	200	10	150	12	p<0,02
557	350	763	340	867	p<0,02
800	962	468	750	840	p<0,0001
983	971	10	815	10	nicht sign.
1000	1146	458	855	830	p<0,0001

#### 1.2.4.3 Anwendungskonzentration des Huminstoffpräparates

[0185] Im ersten Aufzuchtjahr sprechen gleich hohe Verlustraten in beiden Gruppen dafür, dass eine orale Toxizität bei der Applikation des Huminstoffpräparates in einer therapeutischen Dosierung in Höhe eines 5 %igen Zusatzes nicht vorhanden war. In den folgenden zwei Aufzuchtperioden lagen die Verluste in der Versuchsgruppe über denen in der Kontrollgruppe. Auf Grund des Fischotter-Fraßes in der Versuchsgruppe ist jedoch keine genaue Beurteilung möglich.

[0186] Die Anwendungskonzentration des Huminstoff-Präparates betrug 500 mg/kg Körpermasse in Abhängigkeit von der Fütterungsintensität [je % der Lebendmasse]. In der ersten Aufzuchtperiode betrug somit bei einer anfänglichen Fütterungsintensität in Höhe von 10% der Bestandsmasse die maximale Anwendungskonzentration 5000 mg/kg Körpergewicht. Im zweiten und dritten Aufzuchtjahr betragen bei einer Fütterungsintensität in Höhe von maximal 4% der Bestandsmasse die maximalen Anwendungskonzentrationen 2000 mg/kg Körpergewicht.

[0187] Bei der Betrachtung des Anteils des Huminstoff-Präparates an der Gesamtnahrung ist die Aufnahme der stark wasserhaltigen Naturnahrung mit teilweise hohen Rohasche-Gehalten zu beachten. Es ergibt sich eine gewisse „Verdünnung“ des Huminstoff-Präparateanteils an der Gesamtnahrung. Unter Beachtung eines für die Naturnahrung ermittelten durchschnittlichen Futterquotienten von 10 (SCHRECKENBACH u. ZAHN 1997) resultiert aus der mittleren Bonität der Teiche mit 300 kg Naturnahrung/ha, entsprechend 60 kg/0,2 ha Versuchsteich, ein Naturnahrungs-Anteil von 600 kg (Originalsubstanz) je Aufzuchtperiode. Aus den aufgewendeten Trockenfutter-Mengen und der in den Teichen vorhandenen Naturnahrung folgen die mittleren Anteile des Huminstoff-Präparates an der Gesamtnahrung in Höhe von 0,92% in der ersten, 2,14% in der zweiten und 2,98% in der dritten Aufzuchtperiode.

[0188] Die Aufnahme von Pflanzenteilen, Schlamm und Sand (SCHÄPERCLAUS 1998) bleibt in der Gesamtnahrungs-Menge unberücksichtigt. Bei der Einbeziehung dieser schlecht- bis unverdaulichen Bestandteile würden sich die Anteile des Huminstoff-Präparates weiter verringern.

[0189] Tab. 17: Versuch I, Versuchsgruppe: Einzelne Aufzuchtphasen, aufgewendete Trockenfutter-Mengen, Höhe der Naturnahrung, Anwendungskonzentration des HS-Präparats in Abhängigkeit von der Fütterungsintensität (je % der Bestandsmasse) und berechneter Anteil des HS-Präparates an der Gesamtnahrung (bezogen auf die Originalsubstanz).

Bestandsanwendg.	Trockenfutt.	Naturnahr.	AWK	Anteil a. d. Gesamtnährg.
K0-1 (35000/ha)	135 kg	600 kg	500 mg/kg	0,92 %
K1-2 (5275/ha)	450 kg		KM	2,14 %
K2-3 (3815/ha)	884 kg			2,98 %

1.2.5 Feldversuch bei  $K_{0,1}$  in drei Besatzvarianten (Versuch II): Ergebnis

## 1.2.5.1 Bakteriologische Untersuchung

## Zusammenfassung der bakteriologischen Untersuchungen des Versuchs I und II

[0190] Werden die Ergebnisse der Versuche I und II nach einer Aufzuchtphase bis zu  $K_1$  ausgewertet, ergibt sich mit dem Rangsummentest von White ein Unterschied im bakteriellen Befall. Bei den Fischen der Versuchsgruppe wurde eine deutlich geringere bakterielle Besiedlung der inneren Organe nachgewiesen ( $p < 0,05$ ).

[0191] Tab. 18: Versuch I und II: Bakterieller Befall nach der Aufzuchtperiode zu  $K_1$ . Zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen ergibt sich an Hand der Ergebnisse der Stichproben-Untersuchungen (je  $n = 24$ ) ein Unterschied mit dem Rangsummentest von White ( $p < 0,05$ ).

Grad des Befalls	Versuchsgruppen	Kontrollgruppen
0	22	18
1	2	2
2	0	1
3	0	3

## 1.2.5.2 Wachstum

[0192] Ein Unterschied ( $p < 0,05$ ) ist hinsichtlich der Stückverluste festzustellen. Die geringsten Verluste an Fischen sind in der VG3 bei der höchsten Besatzvariante mit 40000  $K_0$ /ha zu verzeichnen.

## 1.2.5.3 Anwendungskonzentration des Huminstoffpräparates

[0193] Die für die erste Aufzuchtperiode des Versuchs I gemachten Ausführungen finden entsprechend Anwendung auf den Versuch II. Da in der V

[0194] Die Verlustraten in den Gruppen sprechen dafür, dass eine orale Toxizität bei der Applikation des Huminstoffpräparates in einer therapeutischen Dosierung in Höhe eines 5 %igen Zusatzes nicht vorhanden war. In der VG3 ist sogar ein deutlich geringeres Verlustgeschehen zu beobachten, wodurch ein gewisser detoxifizierender Effekt angenommen werden kann.

[0195] Die Anwendungskonzentration des Huminstoff-Präparates betrug 500 mg/kg Körpermasse in Abhängigkeit von der Fütterungsintensität [je % der Lebendmasse]. In der ersten Aufzuchtperiode betrug somit bei einer anfänglichen Fütterungsintensität in Höhe von 10% der Bestandsmasse die maximale Anwendungskonzentration 5000 mg/kg Körpergewicht.

[0196] Analog zum Versuch I ist bei der Betrachtung des Anteils des Huminstoff-Präparates an der Gesamtnahrung die Aufnahme der stark wasserhaltigen Naturnahrung mit teilweise hohen Rohasche-Gehalten zu beachten. Es ergibt sich eine gewisse „Verdünnung“ des Huminstoff-Präparateanteils an der Gesamtnahrung. Gleichfalls werden für die gesamte Aufzuchtperiode 300 kg/ha, entsprechend 75 kg/0,2 ha Teich, Naturertrag angesetzt. Da zwar analog zum Versuch I die Pelletfütterung 87 Tage durchgeführt, jedoch erst am 63. Versuchstag begonnen wurde, können für den geringeren spätsommerlichen Anteil der Naturnahrung nur ein Drittel, entsprechend 25 kg Naturertrag angesetzt werden. Es ergibt sich nach SCHRECKENBACH und ZAHN (1997) bei einem  $FQ = 10$  ein Anteil der Naturnahrung von 250 kg (Originalsubstanz).

[0197] Aus den aufgewendeten Trockenfutter-Mengen und der in den Teichen vorhandenen Naturnahrung folgen die mittleren Anteile des Huminstoff-Präparates an der Gesamtnahrung in Höhe von 2,92% in der VG1, 3,02% in der VG2 und 3,06% in der VG3.

[0198] Tab. 19: Versuch II, Versuchsgruppen: Besatzintensität bei der Aufzucht von  $K_{v-1}$ , aufgewendete Trockenfutter-Mengen, Höhe der Naturnahrung, Anwendungskonzentration des HS-Präparats in Abhängigkeit von der Fütterungsintensität (je % der Bestandsmasse) und berechneter Anteil des HS-Präparates an der Gesamtnahrung (bezogen auf die Originalsubstanz).

Bestandsanwendg.	Trockenfutt.	Naturnahr.	AWK	Anteil a. d. Gesamtnahrg.
$K_{v-1}$ (20000/ha)	562 kg	250 kg	500 mg/kg	2,92 %
$K_{v-1}$ (30000/ha)	609 kg		KM	3,02 %
$K_{v-1}$ (40000/ha)	629 kg			3,06 %

#### 1.2.6 Forellenaufzucht in Aquarien (Versuch III): Ergebnis

##### 1.2.6.1 Allgemeinverhalten und Entwicklung

[0199] Alle Fische zeigten über den Versuchszeitraum von insgesamt 166 Tagen eine sehr hohe Vitalität, wuchsen gleichmäßig und zeigten keine Anzeichen von Entwicklungsstörungen. Verluste traten nicht auf.

##### 1.2.6.2 Anwendungskonzentration der Huminsäure Typ 67 A

[0200] In der Versuchsgruppe konnte die orale Toxizität bei der Applikation des Huminstoffs in einer therapeutischen Dosierung in Höhe eines 5%igen Zusatzes über das Versuchsfutters in einem Zeitraum von 166 Tagen nicht ermittelt werden. Die Anwendungskonzentration betrug 500 mg/kg Körpermasse in Abhängigkeit von der Fütterungsintensität [je % der Lebendmasse]. Bei einer Fütterungsintensität von 6% der Lebendmasse wurde eine maximale Anwendungskonzentration von 3000 mg/kg Körpermasse/Tag erreicht. Während der zeitweisen restriktiven Fütterung in Höhe von 1,5% der Lebendmasse ergab sich eine minimale Anwendungskonzentration von 750 mg/kg Körpermasse/Tag.

##### 1.2.6.3 Eigenschaften der Futter, der Fäzes und Beeinflussung der Wassereigenschaften

[0201] Beide Futter wurden über die gesamte Versuchszeit sehr gut angenommen. Den Futtern wird eine sehr gute Akzeptanz bescheinigt.

[0202] Nach der Verfütterung des Kontrollfutters kam es infolge eines rascheren Zerfalls von Futter- und Kotbestandteilen innerhalb kurzer Zeit zu einer milchigen Trübung des Wassers. Im Vergleich zum Versuchsaquarium befanden sich deutlich weniger, ca. halb so viel, Futter- und Kotbestandteile am Boden. Die Wassertrübungen traten verstärkt bei höheren Temperaturen ( $\geq 18^\circ\text{C}$ ) auf und konnten dann auch nicht restlos durch den Wasserwechsel beseitigt werden.

[0203] Das Versuchsfutter dagegen besaß eine dunklere Färbung, eine höhere Konsistenz und damit eine höhere Bruchfestigkeit. Es zerfiel langsamer im Wasser. Auch der im Vergleich zu den Kontrollfischen dunkler gefärbte Kot der Versuchsfische war von höherer Konsistenz und löste sich im Wasser langsamer auf.

##### 1.2.6.4 Entstehung und Untersuchung von Biofilmen

[0204] Im Kontrollaquarium war zu beobachten, dass sich nach 6 Wochen (43. Tag) auffällige, herdförmige, schmierige braune Beläge gebildet hatten. Im Versuchsaquarium war nach 9 Wochen (64. Tag) ein mehr oder weniger unauffälliger, leichter und gleichmäßig verteilter bräunlicher Belag sichtbar, der vor allem die Bodenscheibe betraf. Zum selben Zeitpunkt war der Biofilm in der Versuchsgruppe schon deutlich stärker entwickelt. Die geringere Entwicklung des Bewuchses setzte sich bis zum Versuchsende fort.

[0205] Bei der Entnahme der Biofilm-Proben in der 20. Versuchswoche (138. Tag) wurde auf der Bodenscheibe des Kontrollaquariums ein ungefähr doppelt so starker Bewuchs gegenüber dem Versuchsaquarium festgestellt. Die mikroskopische Untersuchung ergab in der Kontrollgruppe einen starken Gehalt an Kieselalgen der Gattung *Navicula* sowie an Rädertierchen. Die untersuchte Probe war stark belebt. In der Versuchsgruppe konnten wesentlich weniger Algen, Ziliaten sowie ein Niederschlag von Huminstoff-Teilchen nachgewiesen werden. Die Probe war mäßig belebt.

[0206] Die durch die bakteriologische Untersuchung angezüchteten Bakterien konnten mit den in der Veteri-

närmedizin üblichen Nährmedien nicht differenziert werden. Somit kann von spezifischen Wasserbakterien ausgegangen werden. Übliche fischpathogene und auf den Säugetierorganismus übertragbare Keime waren nicht nachweisbar.

### 1.3 Einsatz von natürlichen und synthetischen Huminstoffen in Kombination mit Wasserstoffperoxid zur Eibehandlung bei der künstlichen Erbrütung von Karpfeneiern

#### 1.3.1 Tiere, Material und Methoden

##### 1.3.1.1 Tiere

[0207] Es wurden Karpfen in einer Teichwirtschaft zur Laichreife gebracht und die entommenen Eier nach der künstlichen Befruchtung bis zum Schlupf erbrütet.

##### 1.3.1.2 Versuchsanlage

[0208] Die befruchteten Eier wurden in Erbrütungsgläser überführt. In diesen trichter- bzw. zylinderförmigen Gläsern (7 Liter) strömte gefiltertes Wasser von unten nach oben. Dadurch hielten sich die Eier immer in Bewegung. Nach 3-4 Tagen schlüpfte die Karpfenbrut.

##### 1.3.1.3 Testsubstanzen

[0209] Es wurden einmal natürlicher Braunkohle-Huminstoff in Form der 10%igen Huminstoff-Lösung (nHS) und weiterhin synthetischer Huminstoff (sHS) zur Eibehandlung in Kombination mit Wasserstoffperoxidlösung 30% (WP) überprüft.

[0210] Als Vergleichssubstanz diente Malachitgrünoxalat (MG).

##### 1.3.1.4 Intention

[0211] Bei der künstlichen Befruchtung erhält man meistens 75-95% tatsächlich befruchtete und lebensfähige Eier. Ein Problem bei der mehrtägigen Erbrütung ist die Verpilzung der Eier. Pilzsporen sind ubiquitär verbreitet. Zuerst werden unbefruchtete tote Eier befallen. Später kann die Verpilzung auch auf befruchtete lebende Eier übergreifen. Je stärker ein befruchtetes Ei von der Verpilzung betroffen ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit auf einen erfolgreichen Schlupf. Um einer Verpilzung entgegenzuwirken, werden die Eier üblicherweise mit Malachitgrünoxalat behandelt. Die Anwendung von MG ist mit vielen Nachteilen verbunden (z. B. cancerogenes und mutagenes Potential), deshalb wurde nach Alternativen gesucht.

##### 1.3.1.5 Behandlungsregime

[0212] Die HS wurden mit zwei verschiedenen Einwirkzeiten und in verschiedenen Konzentrationen jeweils gegenüber der bewährten Malachitgrünoxalat-Behandlung und einer unbehandelten 0-Probe überprüft. Die Einwirkzeiten des täglichen HS-Bades betragen 2 min oder 1 Stunde. Vor der HS-Anwendung wurde jeweils eine Wasserstoffperoxidbehandlung durchgeführt; bei der ersten Behandlung in einer Konzentration von 0,5‰, nachfolgend von 0,25‰.

[0213] Insgesamt stehen die Ergebnisse aus 15 Versuchsreihen mit je 5...7 Versuchsgruppen, davon aber immer eine Gruppe mit Malachitgrünoxalat-Behandlung und eine 0-Probe zur Verfügung.

[0214] Es wurden pro Versuchsgruppe zwischen 200...800 ml Laich, jeweils gleichmäßig auf die einzelnen Zuger-Gläser verteilt, verwendet.

##### 1.3.1.6 Untersuchungen

[0215] Der Behandlungserfolg wurde durch die Untersuchung einer Stichprobe ermittelt. Dazu wurden je Versuchsgruppe 1000 Eier ausgezählt und hinsichtlich des Auftretens und des Grades einer Verpilzung beurteilt.

#### 1.3.2 Ergebnisse

##### 1.3.2.1 Einfluß der Behandlungen auf Pilzbefall: Vergleich der zusammengefassten Gruppen

[0216] Untersucht wurden vier Hauptgruppen: ohne Behandlung sowie HS (inkl. WP)-, WP (allein)- und MG-Behandlung. Die HS-Gruppe wurde nach den Gesichtspunkten Behandlungsdauer (1 h, 2min), Art der HS

(natürlich, synthetisch) sowie der Dosierung (niedrig, hoch) unterteilt. Zielgröße ist der Anteil an verpilzten Fischeiern in Prozent.

[0217] Zunächst wurden die Hauptgruppen verglichen, wobei die Ergebnisse aller HS-Behandlungen gemittelt wurden Tab. 20: Künstliche Erbrütung von Karpfeneiern: Verpilzungsraten (%) der Eier in den Hauptgruppen ohne Behandlung, Huminstoff, Malachitgrünoxalat und Wasserstoffperoxid sowie Anzahl der untersuchten Eier der Stichproben (n).

Behandlung	oB	HS	MG	WP
Verpilzungsrates	5,2%	1,8%	1,1%	2,4%
n	11000	39000	13000	8000

[0218] Alle Behandlungsgruppen wiesen signifikant niedrigere Verpilzungsraten auf als die unbehandelte Gruppe ( $p < 0,00001$ ). Die MG-Behandlung war signifikant wirksamer als WP und HS ( $p < 0,00001$ ), HS (summiert) war wirksamer als WP ( $p < 0,001$ ).

### 1.3.2.2 Art der HS

[0219] Die Art des HS (natürlich, synthetisch) unterschied sich bei der kurzzeitigen Behandlung (1,8% (7000) vs. 2,87%(7000)) signifikant ( $p < 0,0001$ ), nicht dagegen bei der einstündigen Behandlung signifikant, wenn jeweils über alle Dosierungen gemittelt wurde. Da sich die Dosierungen bei kurzer und langer Behandlung nicht unmittelbar vergleichen lassen, ist dieses Ergebnis nicht überzubewerten.

[0220] Da, wie sich später herausstellt, die einstündige Behandlung vorteilhaft ist, und sich bei der einstündigen Behandlung keine Unterschiede ergeben, ist generell von fehlenden Unterschieden nHS vs. sHS auszugehen.

[0221] Im folgenden kann deshalb bei Daten von einstündiger Behandlung nHS und sHS zusammengefasst werden.

### 1.3.2.3 Behandlungszeit

[0222] Ein Ansatzpunkt für den Vergleich ist die Verwendung des Produktes aus Behandlungszeit und -konzentration.

[0223] Tab. 21: Künstliche Erbrütung von Karpfeneiern: Produkt aus Behandlungszeit (min) und -konzentration (mg/l) der Huminstoffbehandlung.

Zeit	Konzentrat.	Produkt
2	75	150
2	150	300
2	300	600
2	1000	2000
60	12,2	732
60	16,7	1002
60	18,2	1092
60	22,2	1332
60	24,4	1464
60	25	1500
60	33,3	1998
60	44,4	2664
60	50	3000
60	66,7	4002

[0224] Nach diesem Konzept lassen sich die Behandlungen 2' 300 mit 1h 12,2 + 16,7 + 18,2 sowie 2' 1000

und 1h 22,2 ..33,..50 vergleichen.

Gruppe (nHS+sHS)	2' 300	1h <20
Daten	1,4	1,3
	3,7	3,6
		0,8
		3,2
		1,2
MW	2,55	2,02
N	2000	5000

[0225] Resultat: kein signifikanter Unterschied

Gruppe	2' 1000	1h>20,<=50
Daten	0,8	1,7
	1,4	0,7
		5,1
		1,8
		2,7
		1,1
		2,4
		0
		1
		1,6
		0,7
		0
		2,4
		2,7
		0
		0
		1,2
		1,4
MW	1,1	1,47222222
N	2000	18000

[0226] Resultat: kein signifikanter Unterschied

[0227] Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Betrachtung der Varianz der Ergebnisse. Es fällt die höhere Varianz der 2'-Ergebnisse auf. Eine niedrigere Varianz der 1h-Behandlungszeit spricht für diese Verabreichungsform.

2'	1h
4,3	5,4
6,3	3
7,1	1,7
4,9	1,3
1,1	0,7
7,2	3,6
2	5,1
3,7	0,8
3,2	1,8
2	3,2
0,8	2,7
1,4	1,2
1,2	1,1
4,3	2,4
4	0
0,1	1
0	0,2
1,4	1,6
3,7	0,8
	0,7
	0
	2,4
	2,7
	0
	0
	1,2
	1,4
Standar- dabwe- chung:	
2,241	1,452
Varianz	
5,02	2,11

[0228] F-Test:  $p < 0,05$

[0229] Die Varianzen sind signifikant unterschiedlich.

#### 1.3.2.4 Behandlungsdosis

[0230] Zur Beurteilung der Behandlungsdosis wurden die Werte für 1h Behandlung verwendet. Für beide Behandlungsarten nHS und sHS waren bei Dosen  $\geq 44,4$  weniger Fischeier pilzbefallen (nHS: 0,8% vs. 1,8% ( $p < 0,00001$ ) bzw. sHS: 0,7% vs. 1,8% ( $p < 0,0005$ )).

## 1.3.2.5 Vergleich der HS bei optimaler Behandlungsdosisdauer mit Hauptgruppen

[0231] Wurden die Daten Dosis > 40 mg/l, Dauer = 1h, nHS + sHS mit den anderen Hauptgruppen verglichen, wurden folgende Unterschiede gefunden.

[0232] Tab. 22: Künstliche Erbrütung von Karpfeneiern: Vergleich der Verpilzungsraten (%) der mit > 40 mg/l und 1h mit Huminstoff-behandelten Eier mit den Hauptgruppen ohne Behandlung, Malachitgrünoxalat und Wasserstoffperoxid sowie Anzahl der untersuchten Eier der Stichproben (n).

Behandlung	oB	nHS+sHS, >40, 1h	MG	WP
Verpilz.rate	5,2%	0,77%	1,1%	2,4%
n	11000	8000	13000	8000

[0233] Damit ist eine Behandlung mit nHS und sHS in einer Konzentration ab 40 mg/l und der Dauer von einer Stunde signifikant besser als

oB:  $p < 0,00001$

WP:  $p < 0,00001$

MG:  $p < 0,02$

D.h., es kann gezeigt werden, dass bei optimaler Behandlung signifikant bessere Ergebnisse erzielt werden als mit MG.

## 1.3.3 Zusammenfassung

[0234] Einen Schwerpunkt bei der künstlichen Erbrütung von Karpfeneiern bildet die Bekämpfung des Befalls der Eier mit Saprolegnia-Arten. Die Pilzbekämpfung erfolgt häufig mit dem bezüglich der Rückstandsproblematik, Mutagenität, Teratogenität und Kanzerogenität nicht ungefährlichen Malachitgrünoxalat.

[0235] Zusammenfassend kann eingeschätzt werden, daß die fungizide Wirkung der Kombinationsbehandlung aus Huminstofflösung und Wasserstoffperoxid gegenüber einer Malachitgrünoxalatbehandlung eine zu empfehlende Alternative darstellt. Bei optimaler Behandlung hinsichtlich Behandlungsdauer und -konzentration (mehr als 40 mg/l natürlicher oder synthetischer HS über eine Stunde) wurden signifikant bessere Ergebnisse erzielt als bei Malachitgrünoxalat. Diese Behandlung zeichnet sich weiterhin durch ihre gute Umweltverträglichkeit aus. Im Gegensatz zu Malachitgrünoxalat kommt es zu keiner Rückstandsbildung im Organismus.

**Patentansprüche**

1. Verwendung natürlicher und synthetischer Huminstoffe zur Prophylaxe und Therapie von multifaktoriellen Erkrankungen bei Fischen durch Eintrag einer 10%igen Lösung der Huminstoffe in ein Bad bis zu einer Endkonzentration von 10 bis 100 mg/l und einer vier- bis zwölfmaligen Behandlung der Fische im Tagesrhythmus von je einer bis zwei Stunden Dauer.

2. Verwendung natürlicher und synthetischer Huminstoffe zur Prophylaxe und Therapie von multifaktoriellen Erkrankungen bei Fischen durch Eintrag einer 10%igen Lösung der Huminstoffe in ein Bad bis zu einer Endkonzentration von maximal 10 mg/l im Dauerbad.

3. Verwendung natürlicher und synthetischer Huminstoffe als Futterzusatz zur Ertragssteigerung bei der Aufzucht und Haltung von Fischen durch Zusatz zum Fischfutter bis zu einem Anteil von 5%.

4. Verwendung natürlicher und synthetischer Huminstoffe als Futterzusatz zum Sauberhalten und Reduzieren eines Bewuchses von Algen und anderen einzelligen Organismen in Fischgewässern und Fischhaltungseinrichtungen durch Zusatz zum Fischfutter bis zu einem Anteil von 5%.

5. Verwendung natürlicher und synthetischer Huminstoffe zum Sauberhalten und Reduzieren eines Bewuchses von Algen und anderen einzelligen Organismen in Fischgewässern und Fischhaltungseinrichtungen durch Zugabe einer Wirkstofflösung mit einem Natriumhumat-Huminsäuregehalt von 10% bis zu einer Wirkstoffkonzentration von 10 mg/l im Bad.

6. Verwendung natürlicher und synthetischer Huminstoffe in Verbindung mit Wasserstoffperoxid zur Prophylaxe und Therapie von Eiverpilzungen bei Fischen, wobei der Huminstoffbehandlung die Wasserstoffpero-

xidbehandlung zeitlich vorhergeht mit einer in der Höhe gewählten maximalen Konzentration des Peroxids, bei der die Eier im Wasser noch nicht aufsteigen, die bei Karpfeneiern ca. 0,5 Promille bis 0,25 Promille entspricht.

7. Verwendung natürlicher und synthetischer Huminstoffe allein zur Prophylaxe und Therapie von Eiverpilzungen bei Fischen.

8. Verwendung natürlicher Huminstoffe nach den Ansprüchen 1 bis 8 in Form eines Natriumhumat-Huminsäuregemisches aus Braunkohle als Ausgangsmaterial.

9. Verwendung künstlicher Huminstoffe nach den Ansprüchen 1 bis 8, erhalten aus Hydrochinon.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen