

Einflüsse des Managements und äußerer Haltungsbedingungen auf den Afrikanischen Raubwels *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) in Kreislaufanlagen (RAS)

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

Kumulative Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Institut für Biowissenschaften

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

M.Sc. Marc-Christopher Hildebrand

Geb. am 13.01.1989 in Detmold

Rostock 11.04.2025



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht-kommerziell - Weitergabe
unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz.

Gutachter:

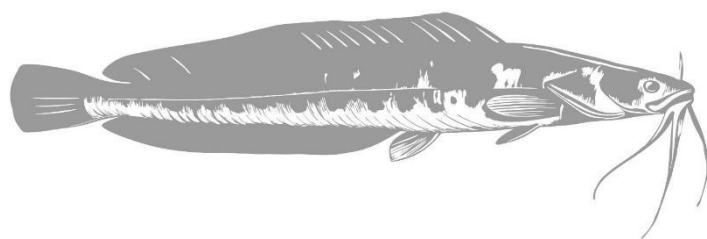
Prof. Dr. Harry W. Palm, Professur für Aquakultur an der Universität Rostock

Prof. Dr. rer. nat. habil. Birger Puppe, Tierhaltung Forschungsinstitut für Nutztierbiologie (FBN)

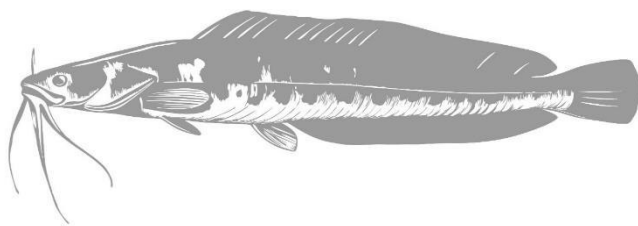
Prof. Dr. rer. nat. Dieter Steinhagen Tierärztliche Hochschule Hannover

Jahr der Einreichung: 2025

Jahr der Verteidigung: 2025



Für meine Eltern



Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	i
II. Abbildungsverzeichnis	iii
III. Tabellenverzeichnis.....	iii
IV Anhangsverzeichnis.....	iii
V. Zusammenfassung	iv
VI. Abstract	vi
VII. Struktur	viii
1. Einleitung.....	10
1.1 Die Aquakultur in der Welt, der EU und in Deutschland	10
1.2 Geschichte der Aquakultur und die Entstehung von modernen Kreislaufanlagen (RAS)	12
1.3 Aquaponik: Eine synergetische Nutzung von Fisch und Pflanze.....	14
1.4 Management von Fischen in Aquakulturanlagen	16
1.4.1 Moderne Haltungsbedingungen in der Fischzucht	16
1.4.2 Die Besatzdichte und ihr Einfluss auf die Entwicklung von Zuchtfischen	17
1.4.3 Fütterungsmanagement in der Aquakultur	18
1.4.4 Hygienische Herausforderungen in Aquakulturanlagen	19
1.4.5 Management von Zuchtfischbeständen in RAS-Aquakulturanlagen	21
1.5 Äußere Haltungsbedingungen: Management und Bedeutung für die Fischzucht	22
1.5.1 Physikalische Haltungsbedingungen	22
1.5.2 Chemische Haltungsbedingungen	30
1.6 Der Afrikanische Raubwels <i>Clarias gariepinus</i> (Burchell, 1822) in der Aquakultur.....	34
2. Ziele und Hypothesen.....	39
3. Diskussion	40
3.1 Herausforderungen im Besatzdichtenmanagement von Afrikanischen Raubwelsen	40
3.2 Verbesserungsansätze im Fütterungsmanagement zur Reduzierung der Stressbelastung für <i>C. gariepinus</i> – Kulturen in kommerzieller Zucht	43
3.3 Einflüsse angepasster Lichtbedingungen und ihr Potenzial zur Verbesserung von industriellen Haltungsbedingungen in kommerziellen Zuchtanlagen	46
3.4 Einsatzmöglichkeiten für Zn basierte Mikronährstoffdünger in <i>C. gariepinus</i> Zuchtanlagen mit aquaponischer Kopplung.....	49
3.5 Toleranzkonzentrationen für eisenhaltige Mikronährstoffdünger im Aquakulturkanalwasser und ihre Auswirkungen auf einen Raubwelsbestand	52
3.6 Blick in die Zukunft:Nutzen für Fischzüchter mit Aquaponikanlagen.....	56
4. Fazit	60
5. Literaturverzeichnis	62

6. Publikationen.....	97
6.1 Effects of stocking density, size, and external stress on growth and welfare of African catfish (<i>Clarias gariepinus</i> Burchell, 1822) in a commercial RAS.	97
6.2 The influence of different feeding time managements on the growth and stress response of the African catfish <i>Clarias gariepinus</i> (Burchel, 1822) under farming conditions	117
6.3 The role of light in the rearing of <i>Clarias gariepinus</i> larvae: Effects on behavior, growth and survival.....	130
6.4 Effects of Zn-EDTA on the health and welfare of the African catfish, <i>Clarias gariepinus</i> (Burchell, 1822), in a recirculating aquaculture system.	139
6.5 Effects of Fe-DTPA on health and welfare of the African catfish <i>Clarias gariepinus</i> (Burchell, 1822).....	157
7. Publikationsliste und Beschreibung des Beitrags	180
8. Eigenständigkeitserklärung.....	182
9. Danksagung	184
10. Anhang.....	186
10.1 Abbildungen	186
10.2 Tabellen	192
11. Curriculum vitae	203

I. Abkürzungsverzeichnis

Afr.:	Afrikanisch	Eurostat:	Statistische Amt der Europäischen Union
AQ:	Aquakultur	EWG:	Europäische Wirtschafts-gemeinschaft
Aquap.:	Aquaponik	FAO:	Welternährungsfonds der Vereinten Nationen
B:	Bor	FCR:	Futtermittelumwandlungsrate
BMEL:	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft	Fe:	Eisen
BRD:	Bundesrepublik Deutschland	FIFO:	„Fish-In-Fish-Out“-Relation
bzw.:	Beziehungsweise	Fischanzahl/L:	Fischanzahl pro Liter
ca.:	Circa	FischHV:	Fischhygiene-Verordnung
Ca:	Calcium	FischSeuchV:	Fischseuchen-Verordnung
Cd:	Cadmium	FIZ:	Fisch-Informationszentrum
CF:	Fultons Konditionsfaktor	g:	Gramm
Cu:	Kupfer	ggf.:	Gegebenenfalls
d.h.:	Das heißt	H⁺:	Wasserstoff/ Protonen
DAFF:	Department of Agriculture, Forestry and Fisheries	H₂S:	Schwefelwasserstoff
dB:	Decibel	H₃O⁺:	Oxonium-Ionen
DESTATIS:	Bundesamt für Statistik in Deutschland	HCO₃⁻:	Hydrogenkarbonat
DO:	Gelöster Sauerstoff	HE:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
DTPA:	Diethylentriaminpenta-essigsäure-Komplex	HEDTA:	N-(2-Hydroxyethyl)ethylendiamin-N,N',N'-triessigsäure
EC:	Leitfähigkeit	HPI- Achse:	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
EDDHA:	Ethylendiamin-N,N'-bis(2-Hydroxyphenyl)essigsäure)-Komplex	Hz:	Hertz
EDTA:	Ethylendiamintetra-essigsäure-Komplex	IHN:	Infektiöse hämatopoetische Nekrose
EFF:	Europäischer Fischereifonds	ISA:	Infektiöse Lachsanämie
EG:	Europäische Gemeinschaft	Jh.:	Jahrhundert
EMFAF:	Europäischer Meeres-, Fischerei- und Aquakulturfonds	K:	Kalium
EMFF:	Europäischer Meeres- und Fischereifonds	kg	Kilogramm
engl.:	Englisch	kg/m²:	Kilogramm pro Quadratmeter
et al.:	Et alii, et aliae, et alia (und andere)	kg/m³:	Kilogramm pro Kubikmeter
etc.:	Et cetera (und andere)	KHV-I:	Koi-Herpesvirus-Infektion
EU:	Europäische Union	kHz:	Kilohertz
EUMOFA:	Europäische Marktbeobachtungsstelle für Fischerei- und Aquakulturerzeugnisse	Konz.:	Konzentration
		L:	Liter
		Lumen:	Lichtstrom einer Lichtquelle
		Lux:	Beleuchtungsstärke
		m:	Meter

m²:	Quadratmeter	ref.:	Referenz
m³:	Kubikmeter	RMS:	(Root Mean Square)
mg:	Milligramm	rpm:	Umdrehungen pro Minute
mg/L:	Milligramm pro Liter	S.:	Seite
Mg:	Magnesium	s. l.:	Sensu lato
Mio.:	Millionen	s. o.:	Siehe oben
mL:	Milliliter	s. s.:	Sensu stricto
mm:	Millimeter	S:	Schwefel
mmol:	Millimol	SGR:	Spezielle Wachstumsrate
Mn:	Mangan	sog.:	Sogenannte
Mo:	Molybdän	sp.:	Spezies, Art
Mol:	Stoffmenge in Mol	spp.:	Species pluralis (mehrere, nicht einzeln genannte Arten)
MRCCC:	Mary River Catchment Coordinating Committee	Std.:	Stunde
Mrd.:	Milliarde	t:	Tonnen
ms:	Millisekunde	TAAPs/TAADs:	Grenzüberschreitende hochansteckende Wassertier-Pathogene/ Krankheiten
MT:	Metallothionein-Protein	TierSchG:	Tierschutzgesetz
N:	Stickstoff	tsd:	Tausend
NASTAQ:	Nationaler Strategieplan für die Verbesserung der Aquakultur in Deutschland	u. a.:	Unter anderem
NH₃:	Ammonium	u. U.:	Unter Umständen
NH₄⁺:	Ammoniak	USD:	US-Dollar
nm:	Nanometer	VDF:	Verband Deutscher Fischereiverwaltungsbeamter und Fischereiwissenschaftler e. V.
NO₂⁻:	Nitrit	VHS:	Virale hämorrhagische Septikämie
NO₃⁻:	Nitrat	W:	Watt
O:	Sauerstoff (elementar)	W/m²/nm:	Bestrahlungsstärke
O₂:	Sauerstoff (Molekül)	WSD:	White Spot Disease
O₃:	Ozon	z. B.:	Zum Beispiel
OIE:	Internationales Tierseuchenamt	Zn:	Zink
p:	Signifikanzniveau	λ/nm:	Wellenlänge in Nanometern
P:	Phosphor	%:	Prozent
pO₂:	O ₂ -Partialdruck	≤:	Kleiner gleich
ppb:	Parts per Billion	≥:	Größer gleich
ppm:	Parts per Million	&	Und
PSE:	Periodensystem der Elemente	µg/L:	Mikroliter pro Liter
qPCR:	Quantitative polymerase Kettenreaktion	µPa:	Mikropascal
RAS:	Kreislaufanlagen (engl. Recirculating Aquaculture Systems)	µM:	Mikromol

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Fischerei- und Aquakulturproduktion in Mio. t bis ins Jahr 2020.	10
Abbildung 2: Konzept einer RAS-Aquakulturanlage.....	13
Abbildung 3: Das Aquaponik-Funktionsschema.	15
Abbildung 4: Akustisches Wahrnehmungsvermögen verschiedener Fischarten.....	29
Abbildung 5: Prozentualer Anteil an chelatisiertem Eisen unter verschiedenen pH-Werten.....	33
Abbildung 6: Foto eines Afr. Raubwelses (<i>Clarias gariepinus</i>) in einer RAS-Aquakulturanlage.....	34
Abbildung 7: Einblick in das Suprabranchialorgan von <i>Clarias gariepinus</i>	35
Abbildung 8: Weber'scher Apparat von <i>Clarias gariepinus</i>	38
Abbildung 9: <i>Clarias gariepinus</i> Leukogramm der Fe-DTPA Studie.....	54

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Besatzdichtendefinition nach Pasch (2022). Besatzdichten in RAS-Anlagen.....	17
--	----

IV. Anhangsverzeichnis

Anhang 10.1: Abbildungen	187
Anhang 10.1.1: Globale Aquakulturproduktion führender Produktionsgebiete.....	187
Anhang 10.1.2: Konzept einer RAS-Aquaponikanlage.....	188
Anhang 10.1.3: Foto eines Afr. Raubwelses (<i>Clarias gariepinus</i>) in einer RAS-Aquakulturanlage. ...	189
Anhang 10.1.4: Foto eines Afr. Raubwelses (<i>Clarias gariepinus</i>) in einer RAS-Aquakulturanlage ...	189
Anhang 10.1.5: Fruchtbarkeitskorrelation eines weiblichen Afr. Raubwelses	190
Anhang 10.1.6: Stressantwort bei Fischen.....	191
Anhang 10.1.7: Leukozyten von <i>Clarias gariepinus</i>	192
Anhang 10.2: Tabellen	193
Anhang 10.2.1: Konzentrationen von gelösten Nähr- und Schadstoffen im Prozesswasser	193
Anhang 10.2.2: Pflanzennährstoffe für Paprika (<i>Capsicum annuum</i> L.)	194
Anhang 10.2.3: Primerliste der untersuchten Referenz- und Zielgene bei <i>Clarias gariepinus</i>	196
Anhang 10.2.4: Klassifizierungshorizont des Schweregrads histologischer Veränderungen	199
Anhang 10.2.5: Vorschlag für ein Konditionierungsmodell für <i>Clarias gariepinus</i> mittels Licht.....	199

V. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie zielte darauf ab, Optimierungsmöglichkeiten in der Haltung und Aufzucht einer für die Aquakultur bedeutenden Zuchtfischart (Afrikanischer Raubwels, *Clarias gariepinus* Burchell 1822) unter Berücksichtigung verschiedener externer Einflüsse (u. a. Besatzdichte, Fütterungszeiten, Licht, Schall und chemische Stressoren) zu identifizieren und auszuwerten. Dabei stand insbesondere das Potenzial zur Steigerung der Produktion und Produktqualität des Afrikanischen Raubwelses im Fokus. Hierfür wurden für die Raubwelse erstmals Effekte realistischer Besatzdichten und Fütterungsroutinen in einem industriellen Kontext, spezielle Beleuchtungsschemata für ihre Haltung, akustische Effekte auf einen Fischbestand sowie Auswirkungen bestimmter chemischer Spurenelemente (Zn-EDTA, Fe-DTPA) im Prozesswasser einer Aquakulturanlage näher untersucht.

Die Auswertung der getesteten Besatzdichten von 100, 200 und 400 kg/m³ ergab, dass Jungfische dieser Fischart in der Mast mit 300 g Körpergewicht unter höheren Besatzdichten (> 100 kg/m³) besser wuchsen, während ältere Fische über 1.500 g bei weniger intensiven Besatzdichten (< 400 kg/m³) bessere Wachstumsraten zeigten. Gleichzeitig wurde ein umgekehrter Zusammenhang zwischen Besatzdichte und Verletzungsgrad beobachtet, wobei Jungfische unter semi-intensiven Bedingungen (100 kg/m³) eine doppelt so hohe Verletzungsrate aufwiesen, wie unter intensiveren Besatzdichten. Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei älteren Fischen festgestellt werden, bei denen die Verletzungsrate unter hoch intensiven Bedingungen (400 kg/m³) niedriger ausfiel als unter einer semi-intensiver Besatzdichte. Untersuchungen zum Fressverhalten der Zuchtfische in einer industrialisierten Umgebung zeigten zudem, dass Afrikanische Raubwelse – entgegen ihrer natürlichen Lichtscheue und Dämmerungsaktivität – Futter über einen längeren Zeitraum auch außerhalb ihrer bevorzugten Aktivitätsphasen aufnehmen können. Hierbei konnte ein Konditionierungseffekt festgestellt werden, welcher es ermöglicht, *C. gariepinus* durch gezielte Licht- und Fütterungssteuerung auf eine erhöhte Futteraufnahmebereitschaft zu trainieren, ohne dabei stressbedingte Indikatoren wie die Plasma-Cortisol-Konzentration zu beeinflussen. Weitere Experimente hatten die Farbwahrnehmung und Lichtempfindlichkeit der Tiere unter spezifischen Beleuchtungseinstellungen zum Inhalt. Junge Afrikanische Raubwelse reagierten unter einem standardisiertem Tageslichtrhythmus besonders sensibel auf blauhaltiges Licht sowie hohe Lichtintensitäten. Hingegen führte eine gelbliche bis warmweiße Beleuchtung zu einer um bis zu 44 % besseren Körperkondition, die in Verbindung mit einer erhöhten Schwimmaktivität auch unter leicht gedimmtem Licht beobachtet wurde. Parallel dazu zeigte eine begleitende Stressuntersuchung, dass Afrikanische Raubwelse äußerst empfindlich auf Vibrationen und akustische Emissionen reagieren, welche direkt ins Wasser übertragen werden. Analytierte Blutwerte von Cortisol und Glukose sowie getestete, genetische Stressmarker (*slc39a8*, *mtf1*) wiesen unter dem Einfluss von Schallemissionen signifikante Veränderungen auf. Darüber hinaus wurde der Einfluss essenzieller Spurennährstoffe (Zn-EDTA, Fe-DTPA) auf *C. gariepinus* näher untersucht. Diese Nährstoffkomponenten beeinflussen nicht nur das Prozesswasser in rezirkulierenden Aquakultursystemen (RAS), sondern sind auch für den Anbau von Nutzpflanzen in aquaponischen Systemen von entscheidender Bedeutung. Während bei pflanzenrelevanten Konzentrationen von 0,5 mg/L Zn-EDTA und 2,5 bis 3,0 mg/L Fe-DTPA weder Jung- noch Altfische Beeinträchtigungen zeigten, führten Konzentrationsspitzen mit bis zu dem Vierfachen der Standardwerte (3,0 mg/L Zn-EDTA, 12,0 mg/L Fe-DTPA) zu ersten Gewebeveränderungen in Leber und Kiemen der Altfische. Derartige Konzentrationen, die weit über den für Pflanzen empfohlenen Werten liegen, sollten infolgedessen vermeiden werden. Darüber hinaus sollte rückgeführtes Prozesswasser aus Aquaponikanlagen in die Aufzuchtbecken für Jungfische des Afrikanischen Raubwelses im Verhältnis 1:4 verdünnt werden,

da ihre Widerstandsfähigkeit in diesem Stadium gegenüber verschiedenen Belastungsformen noch nicht vollständig ausgebildet ist.

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass der Afrikanische Raubwels – obgleich vieler seiner Resilienzen – hinsichtlich einzelner, extremer Haltungsparameter eine anspruchsvolle Fischart ist, deren Haltung durch gezielte Anpassungsmaßnahmen weiter optimiert werden kann. Durch die Regulierung der Besatzdichte, die Anpassung von Fütterungszeiten sowie den gezielten Einsatz der Anlagenbeleuchtung (zur Konditionierung oder zur Verbesserung der Haltung) lassen sich sowohl seine Produktion als auch seine Produktqualität steigern. Zudem schafft die Anreicherung des Prozesswassers mit pflanzenrelevanten Spurenelementen ein wirtschaftliches Potenzial für die Anlagenbetreiber, welche durch den Betrieb von Aquaponikanlagen zusätzliche Einnahmen generieren möchten. Allerdings sollten die Besatzdichten in der Zucht von *C. gariepinus* während der verschiedenen Wachstumsphasen regelmäßig angepasst werden, um nicht nur optimales Wachstum zu gewährleisten, sondern auch langfristige Stressbelastungen durch Fehlbesatz zu vermeiden. Ein wirtschaftlich sinnvoller Kompromiss zwischen ressourcenschonender Produktion und wirtschaftlicher Rentabilität ist hierbei essenziell. Die gezielte Steuerung der Anlagenbeleuchtung während der Fütterungszeiten kann hierbei aufgrund des beobachteten Konditionierungseffekts einen signifikanten Mehrwert für die Haltung von *Clarias gariepinus* darstellen. Derartige Beleuchtungseinstellungen können somit – unter einer gedimmten warmweißen Beleuchtung – sowohl die Haltung als auch die Futteraufnahme des Fischbestandes maßgeblich verbessern. Ein weiteres wesentliches Optimierungspotenzial liegt in der Reduktion von Lärmemissionen innerhalb von Kreislaufanlagen. Dies könnte durch bauliche Maßnahmen, wie die Entfernung von Rohren aus den Haltungsbecken – welche für die Schallübertragung verantwortlich sein können – oder die Verlagerung von Kreislaufpumpen außerhalb der Pumpensümpfe, erreicht werden. Dadurch ließen sich bekannte Defizite in der Futterverwertung und Qualitätsminderungen des Fischfleisches infolge chronischen Stresses effektiv entgegenwirken. Anlagenbetreiber, die eine Integration ihres RAS-Systems in eine Aquaponikanlage erwägen, könnten durch die Verwendung von mit Mikronährstoffen angereichertem Prozesswasser sowohl den Wasserverbrauch senken als auch die Pflanzenproduktion steigern. Somit wäre eine vollständige Wiederverwendung des Wassers in Kreisläufen mit Altfischen (über 1.500 g) sowie eine Teilnutzung von bis zu 25 % in Jungfischkulturen (unter 5 g) möglich.

VI. Abstract

This study aimed to identify and assess potential optimization strategies in the rearing of aquaculture species such as *Clarias gariepinus*, considering various external factors including stocking density, feeding schedules, light conditions, and chemical and acoustic stressors. A primary focus was placed on investigating the potential to enhance both the production and quality of African catfish. For the first time, the effects of realistic stocking densities and feeding routines were analyzed within an industrial setting, alongside the implementation of specialized lighting schemes for catfish, the impact of acoustic disturbances on fish stocks, and the effects of specific chemical trace nutrients (Zn-EDTA, Fe-DTPA) in recirculating aquaculture systems (RAS) process water.

The analysis of stocking densities of 100, 200, and 400 kg/m³ revealed that juvenile fish in the fish-fattening sector weighing less than 300 g grew better at higher stocking densities (> 100 kg/m³), while adult fish over 1500 g exhibited improved growth at lower stocking densities (< 400 kg/m³). Furthermore, an inverse relationship between stocking density and injury rate was observed: juvenile fish under semi-intensive conditions (100 kg/m³) had double the injury rate compared to those under higher stocking densities. A similar pattern was observed in adults, where injury rates were lower under high-intensity conditions (400 kg/m³) compared to semi-intensive densities. Studies on feeding behavior in an industrial environment also revealed that African catfish, contrary to their natural tendency to avoid light and be more active at low light conditions, can consume food over extended periods outside their preferred activity phases. A conditioning effect was noted, allowing *C. gariepinus* to be trained to increase food intake readiness through targeted light and feeding control—without affecting stress indicators like plasma cortisol concentration.

Further experiments focused on the fish's color perception and light sensitivity under different lighting conditions were conducted. Juvenile African catfish were particularly sensitive to blue light and high light intensities operated in a standardized day-night cycle. In contrast, yellowish to warm white lighting resulted in up to a 44 % improvement in body condition, which, combined with increased swimming activity, was also observed under slightly dimmed light. Concurrent stress studies showed that African catfish are highly sensitive to vibrations and acoustic emissions transmitted into the water. Blood analysis of cortisol and glucose, along with genetic stress markers (*slc39a8*, *mtf1*), revealed significant changes under the influence of sound emissions.

The study also examined the impact of chemical stressors (Zn-EDTA, Fe-DTPA). These nutrients, which affect the process water in RAS, are crucial for the cultivation of plants in aquaponic systems. While at plant-relevant concentrations of 0.5 mg/L Zn-EDTA and 2.5 to 3.0 mg/L Fe-DTPA neither juvenile nor adult fish showed adverse effects, peaks of up to four times the standard values (3.0 mg/L Zn-EDTA, 12.0 mg/L Fe-DTPA) resulted in initial tissue damage in the liver and gills of adult fish. Therefore, concentrations above the recommended plant levels should be avoided. Additionally, recycled process water from aquaponics systems should be diluted at a ratio of 1:4 for juvenile African catfish, as their resilience is still developing at this stage.

The study's findings suggest that although African catfish demonstrate resilience to certain extreme rearing conditions, they remain a challenging species whose husbandry can be further optimized through careful management. Adjustments in stocking density, refinement of feeding regimes, and the strategic use of lighting for conditioning or welfare enhancement can markedly optimize the performance of *C. gariepinus* and improve product quality in

aquaculture facilities, while simultaneously promoting animal welfare. Moreover, enriching process water with plant-relevant trace elements provides an economic opportunity for operators of aquaponics systems. However, stocking densities must be adjusted at various growth stages to ensure optimal growth and to prevent long-term stress due to improper stocking. Achieving a balance between resource-efficient production and economic profitability is therefore crucial.

Furthermore, targeted control of lighting during feeding times could provide a significant advantage through the observed conditioning effect. Specifically, warm-white lighting can substantially improve both rearing conditions and feed intake. Another potential optimization lies in reducing noise emissions in recirculating systems. Structural adjustments, such as removing pipes from tanks or relocating circulation pumps outside sump areas, could minimize stress caused by vibration transmissions, improve feed conversion efficiency, and prevent declines in flesh quality associated with chronic stress. Facility operators integrating RAS-based fish production with aquaponics systems could benefit from using micronutrient-enriched process water, which would reduce water consumption while boosting plant production. Full water reuse in adult fish cycles (over 1500 g) and partial reuse (up to 25 %) in juvenile fish cycles (under 5 g) would be possible.

VII. Struktur

Um der weltweit stärker werdenden Nachfrage nach Fisch als Lebensmittel und den damit verbundenen hohen Qualitätsstandards in Deutschland, in der EU und auf der Welt gerecht zu werden, wurden in dieser Studie verschiedene Ansätze untersucht, wie sich die Zucht des Afrikanischen Raubwelses *C. gariepinus* mit besonderem Augenmerk auf eine schonende Haltung weiter optimieren lässt. Neben dem Einfluss von Besatzdichten, Fütterungszeiten sowie Licht- und Schallemissionen wurden Verträglichkeiten der Fische gegenüber Mikronährstoffen untersucht. Die Ergebnisse der Forschungsschwerpunkte sollen dazu beitragen, dass Afrikanische Raubwelse erfolgreicher und auch schonender produziert werden und Produzenten sich durch den Betrieb von aquaponischen Anlagen breiter in ihrem Absatzmarkt positionieren können. Dies soll die Produktion flexibler gestalten und zur Resilienz der Betriebe in Krisenzeiten beitragen.

Diese kumulative Dissertation besteht aus 11 Kapiteln. Kapitel 1 gibt einen Überblick über das Thema der Dissertation. Es werden grundlegende Bestandteile der Entwicklungsgeschichte der Aquakultur und ihre Bedeutung für die Weltwirtschaft bis hin zur Entstehung moderner RAS-Kreislaufanlagen beschrieben. Ein Auszug über die Entwicklung von aquaponischen Anlagen und ihren synergetischen Nutzen für die Pflanzenzucht rundet das Einführungskapitel ab. Im weiteren Verlauf werden die wesentlichen Faktoren in einem RAS-Aquakulturbetrieb aufgegriffen, welche für eine erfolgreiche wirtschaftliche und nachhaltige Produktion von Afrikanischen Raubwelsen von zentraler Bedeutung sind. So werden allgemeine und spezielle Haltungsbedingungen, Futter- und Bestandsmanagement, hygienische Herausforderungen sowie rechtliche Grundsätze einleitend aufgegriffen und ihre Bedeutung für die Fischzucht erläutert. Abschließend wird der Afrikanische Raubwels als zentrales Studienobjekt vorgestellt, wobei seine Einsatzgebiete in der Zucht sowie seine bislang bekannten Verträglichkeiten bezüglich der Haltung hervorgehoben werden. In Kapitel 2 werden sodann die Ziele und Hypothesen dieser Studie aufgezeigt. Diese werden in der anschließenden Diskussion (Kapitel 3) aufgegriffen, wobei die wichtigsten Ergebnisse dieser Studien zusammengefasst und unter Bezugnahme auf die Fachliteratur diskutiert werden. Das Unterkapitel 3.1 befasst sich daher mit den Auswirkungen verschiedener Besatzdichten auf das Wachstum und die Stressbelastung bei Afrikanischen Raubwelsen. Es wird aufgezeigt, dass Raubwelse unter bestimmten Besatzdichten erfolgreicher wachsen. Zusätzlich wird erörtert, welche Faktoren die Fische zu einer Stressreaktion treiben und welche Bedingungen für das Wachstum unter einer bestimmten Besatzdichte geeignet sind. Im darauffolgenden Unterkapitel 3.2 werden neue Daten präsentiert, die zeigen, dass Afrikanische Raubwelse konditionierbar sind und sich diese – entgegen ihrer natürlichen Präferenz zur nokturnalen Aktivität – mittels Training an tägliche Fütterungszeiten gewöhnen lassen. Das Unterkapitel 3.3 widmet sich der Lichtempfindlichkeit von *C. gariepinus*. Hier werden zwei Experimente beschrieben, welche auf das Verhalten, den Habitus und das Wachstum von jungen Raubwelsen auf Lichtfarbe und Lichtintensität abzielen. Dabei werden Parameter vorgestellt, die eine Beeinträchtigung der Verwundung bei Jungfischen durch Bissverletzungen beeinflussen können. In den daran anschließenden Unterkapiteln 3.4 und 3.5 werden zwei Studien präsentiert, die den Einsatz verschiedener Konzentrationsstufen von Eisen- und Zink-Chelaten im Prozesswasser einer RAS-Anlage auf den Afrikanischen Raubwels untersuchten. Beide Studien legen Ergebnisse vor, welche die Auswirkungen der Düngekomponenten auf histologischer, verhaltensbasierter, hämatologischer und genetischer Ebene darstellen. Im Anschluss werden die Einsatzmöglichkeiten beider Nährsalze für die Wels-Aquaponik diskutiert. Kapitel 4 fasst die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen und gibt einen Ausblick auf zukünftige Entwicklungen, welche sich aus den gewonnenen Erkenntnissen für die Aquakultur und

Aquaponik ergeben. In Kapitel 5 erfolgt eine Auflistung der, für die Diskussion genutzten Referenzen. Kapitel 6 stellt die Publikationen vor, in denen die aus Kapitel 2 formulierten Fragestellungen bearbeitet wurden. Eine förmliche Erklärung zur jeweiligen Forschungsleistung der einzelnen Teilstudien findet sich schließlich in Kapitel 7. Die daran anknüpfenden Kapitel 8 und 9 beinhalten förmliche Erklärungen zu dieser Arbeit sowie eine Danksagung. In Kapitel 10 werden weitere Abbildungen und Tabellen als Anhang aufgeführt, um dem Leser zusätzliches Anschauungsmaterial zu bieten. Das letzte Kapitel (Kapitel 11) ist dem Lebenslauf des Autors gewidmet.

1. Einleitung

1.1 Die Aquakultur in der Welt, der EU und in Deutschland

- **Globale Aquakultur**

Fische und Meeresfrüchte liefern ungefähr 17 % des globalen Tierproteins für die menschliche Ernährung (Eurostat, 2023; FAO, 2022, S. vi). Der Verbrauch ist hierbei regional sehr unterschiedlich und reicht je nach Land und Region von unter 5 kg bis weit über 50 kg pro Kopf und Jahr (Eurostat, 2023). Der Pro-Kopf-Verbrauch von Fischen und Meeresfrüchten aus der Fischerei und Aquakultur stieg in den Jahren von 1961 bis 2019 durchschnittlich um 3 % jährlich an und wuchs somit schneller als die Weltbevölkerung (1,6 %) (Eurostat, 2023; FAO, 2022, S. xvi). Gleichzeitig stieg in diesem Zeitraum die globale Nachfrage nach terrestrischen Tierprodukten um durchschnittlich 2,7 % an (Eurostat, 2023; FAO, 2022, S. xvi). Somit wuchs der Pro-Kopf-Verbrauch an Erzeugnissen aus Fischerei und Aquakultur von anfangs 9,0 kg aus dem Jahr 1961 auf 20,5 kg im Jahr 2019 (Eurostat, 2023; FAO, 2022, S. xvi). Erste Schätzungen für das Jahr 2020 gehen von ähnlich hohen Verbrauchszahlen aus (20,2 kg) (Eurostat, 2023; FAO, 2022, S. 1). Die weltweite Produktion von Fischen, Weichtieren (z. B. Muscheln), Krebstieren und weiteren aquatischen Organismen (ohne Pflanzen oder Algen, Reptilien, aquatische Säugetiere etc.) lag im Jahr 2020 bei 177,8 Mio. t (Anlandungen der Fischerei und Aquakulturen zusammen, Abbildung 1; FAO, 2022, S. 4, 31). Allgemein stammten hiervon 49 % der weltweiten Fischproduktion

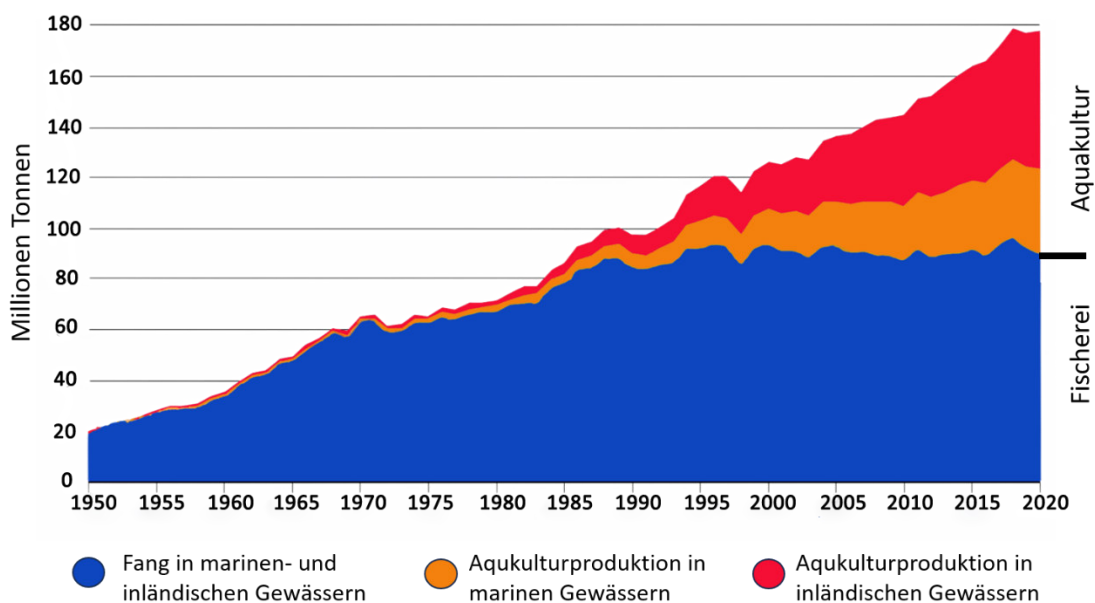


Abbildung 1: Weltweite Fischerei- und Aquakulturproduktion in Mio. t bis ins Jahr 2020. Aus FAO (2022, S. 4).

(87,5 Mio. t u.a. Meeresfrüchte, ohne Algen) aus Aquakulturen (AQ) (Eurostat, 2023; FAO, 2022, S. xvi). Die Aquakultur stellte damit in den vergangenen Jahrzehnten den am schnellsten wachsenden Zweig der Ernährungswirtschaft dar. So wurden bereits 2020 weltweit über 122,6 Mio. t an aquatischen Organismen einem Wert von etwa 281,5 Mrd. US-Dollar (USD) produziert (FAO, 2022, S. 26). Diese enorme Menge an Produktionsgütern schlüsselte sich in ca. 57,5 Mio. t an Fisch, ca. 18 Mio. t an Weichtieren, ca. 11 Mio. t an Krebstieren und ca. 35 Mio. t an produzierten Algen auf, wobei produzierter Fisch schon damals die wichtigste Tiergruppe in der globalen Aquakulturproduktion darstellte (FAO, 2022, S. 26). Der überwiegende Teil der Fischproduktion aus dem Jahr 2020 fand in Aquakulturen im Inland statt (62,2 %). So wurden von

den 2020 produzierten 57,5 Mio. t an Fisch bereits 49,1 Mio. t im Binnenland produziert (FAO, 2022, S. 26). Nach dem Abschlussbericht der FAO aus dem Jahr 2020 stieg die weltweite Fischerzeugung in Aquakulturen im vergangenen Jahrzehnt (2010-2020) durchschnittlich um 4,6 % jährlich an und wird sich wahrscheinlich in den kommenden Jahren noch weiter ausbauen (FAO, 2022, S. 5). Allein in Asien werden heute über 91 % der globalen Aquakulturproduktionsgüter hergestellt (FAO, 2022, S. xvi; Anhang 10.1.1). Im Jahr 2020 wurden nur von der Volksrepublik China fast 57 % der globalen Fische und Meeresfrüchte produziert (FAO, 2022, S. 212). China war somit auch im Jahre 2020 weltweit mit Abstand der größte Erzeuger von Fischen und Meeresfrüchten. Weitere bedeutende Produktionsländer sind Indien, Indonesien, Vietnam, Bangladesch, Ägypten und Norwegen (FAO, 2022, S. 31; Naylor et al., 2023).

- **Europäische Aquakultur**

Seit dem Jahr 2002 wurden von der Europäischen Union (EU) Strategiepläne für die Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit sowie für die nachhaltige Wachstums- und Imageverbesserung der Aquakultur veröffentlicht und zunächst in den Jahren 2008-2013 durch den Europäischen Fischereifonds (EFF) unterstützt (Breuer & Twisk, 2024). Mit den im Jahr 2013 formulierten strategischen Leitlinien und der Gründung des Europäischen Meeres- und Fischereifonds (EMFF) wurde eine Agenda zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit von ökologisch nachhaltigen und innovativen AQ-Investitionen der einzelnen Mitgliedstaaten bis in das Jahr 2020 subventioniert (Breuer & Twisk, 2024). Einen Anschluss fand diese Agenda durch die Veröffentlichung der EU-Verordnung 1380/2013 vom 11.12.2013 im Jahre 2014 und der strategischen Leitlinien (COM 2021/0236) vom 12.5.2021 im Jahr 2021, welche nationale Strategiepläne der Mitgliedsstaaten bis in das Jahr 2030 zur Verbesserung der wirtschaftlichen Wettbewerbsfähigkeit und Resilienz forderte, und eine strategische Ausrichtung der Aquakultur der EU bis zum Ende des Jahrzehnts kennzeichnete (Breuer & Twisk, 2024). Die Förderung der wirtschaftlichen, sozialen und ökologischen Ziele wurde mit dem Europäischen Meeres-, Fischerei- und Aquakulturfonds (EMFAF) fortgesetzt (Breuer & Twisk, 2024). Von den 2020 produzierten 122,6 Mio. t an weltweiten Aquakulturerzeugnissen (Fische, Weichtiere, Krebstiere und Algen) entfielen 1,09 Mio. t auf die EU, davon 0,05 % auf Algen und 99,95 % auf Fischarten (FAO, 2022, S. 30). Dies machte 2020 etwa 1 % (2,7 % in ganz Europa) der globalen AQ-Produktion aus und lag somit deutlich unter dem weltweiten Durchschnitt (Eurostat, 2023). Unter den Mitgliedsstaaten generierten im Jahr 2020 Spanien, Frankreich und Griechenland 67 % des EU-Produktionsvolumens (Europäischer Rechnungshof, 2023, S. 9). Deutschland rangierte auf Platz 9 mit 3,6 % (Eurostat, 2023).

- **Deutsche Aquakultur**

Der Nationale Strategieplan für die Verbesserung der Aquakultur in Deutschland (NASTAQ) wurde von der Bundesrepublik Deutschland (BRD) erstmals im Jahr 2014 vorgestellt und bereits durch eine 2. Ausgabe 2021 bis ins Jahr 2030 ergänzt (NASTAQ, 2020, S. 2). Darin werden der Ausbau der nationalen Produktionskapazitäten von AQ-Erzeugnissen, die Förderung der Wettbewerbsfähigkeit, die Integration in die regionale Wirtschaft, die Verbesserung von Kontrollmechanismen, die Förderung aus dem EMFAF sowie die Anpassung des Wirtschaftssektors an den Klimawandel fokussiert (NASTAQ, 2020, S. 8). Die in 2020 in Deutschland produzierten AQ-Produkte erreichten laut des Bundesamtes für Statistik in Deutschland (DESTATIS) ein Gesamtvolumen von 32,2 Tsd. t (18,6 Tsd. t Fisch, 13,5 Tsd. t Muscheln, < 0,1 Tsd. t andere Produkte; DESTATIS, 2020, S. 56, 2021a, S. 85). Durchschnittlich wurden etwa 8,2 t Fisch von jedem der 2.300 Fisch erzeugenden AQ-Betriebe im Jahr 2020 hergestellt (DESTATIS, 2021b). Die

höchste Dichte an AQ-Betrieben befand sich im Süden Deutschlands (Bayern), wo 1.600 kleinere Betriebe je etwa 3,3 t Fisch produzierten (DESTATIS, 2021b). Mit einem Produktionsvolumen von 68,6 t lag jedoch das durchschnittliche Produktionsvolumen der 11 größten AQ-Betriebe in Mecklenburg-Vorpommern weit über dem bundesweiten Schnitt und war auch insgesamt am höchsten (DESTATIS, 2021b). Die Fischerzeugung in den meisten deutschen AQ-Betrieben konzentriert sich dabei vor allem auf forellenartige und karpfenartige Fische. So stellten verschiedene Forellen- und Saiblingsarten (*Oncorhynchus spp.*) zusammen rund 10,5 Tsd. t und damit mehr als die Hälfte (56,5 %) der gesamten Fischerzeugung im Jahr 2020 dar (DESTATIS, 2021b). Weitere wichtige Fischarten waren der europäische Aal (*Anguilla anguilla*) mit rund 1,2 Tsd. t und der Afrikanische (Afr.) Raubwels (*Clarias gariepinus*) mit 1,0 Tsd. t (DESTATIS, 2021b). Der Pro-Kopf-Verbrauch an AQ-Erzeugnissen lag 2020 in Europa bei etwa 23,82 kg (EUMOFA, 2020). Im Jahr 2019 betrug der Fischkonsum pro Kopf in Deutschland laut dem Fisch-Informationszentrum (FIZ) rund 14 kg. Damit lag er deutlich unter dem europäischen und globalen Durchschnitt, noch bevor er seit den Pandemie Jahren ab 2020 bis auf 12,5 kg im Jahr 2023 zurückging (FIZ, 2024, S. 7).

1.2 Geschichte der Aquakultur und die Entstehung von modernen Kreislaufanlagen (RAS)

• Historie der Aquakultur

In der Anthropologie ist es weithin anerkannt, dass das Kultivieren von Meeresfrüchten (insbesondere Fische) in antiken Gesellschaften in der Entwicklung durch das Fangen und Fallenstellen (Atlas et al., 2021) bis hin zur Haltung und Domestizierung (Balon, 1995; Beveridge & Little, 2002, S. 3–29; Nash, 2011) mehrfach entstand. Die ersten einfachen Systeme für eine Haltung von Karpfen in Gräben (Protoaquakulturen) wurden bereits 2600 v. Chr. in China durch empirische Methodik entwickelt (Nash, 2011). Im Mittelmeerraum wurden im antiken Rom etwa 1.000 Jahre später Zucht- und Kultivierungsstätten für Meeresfrüchte (Vallicoltura-Systeme) von den Etruskern überliefert (Beveridge & Little, 2002, S. 3–29) und von den Römern in Lagunen eingesetzt (Zeuner, 1963). Zudem wird die Domestizierung des Karpfens unter verschiedenen Haltungsformen zu dieser Zeit vermutet (Hoffmann, 1994, 2005). Mit der Ausdehnung des römischen Reiches verbreitete sich auch das Wissen zunehmend in Richtung Mitteleuropa. In der Renaissance wurde nicht nur die Bautechnik für eine künstliche Kultivierung weiter verfeinert, sondern auch die Fischzucht in Teichanlagen weiter perfektioniert (Cooley, 2022). Zu Beginn der Industrialisierung im 19. Jh. wurde auch die künstliche Vermehrung in Fischzuchten in Europa eingeführt, was die Zucht und das Anlagenmanagement revolutionierte (Billard et al., 1995; Wourms, 1997). Gleichwohl reduzierte das Industriezeitalter auch die heimische Artenvielfalt in Europa und es wurden erstmalig Brutstätten mit kontinuierlicher Durchflusstechnik für verschiedene Fischarten eingesetzt, um die Artbestände wieder zu stabilisieren und um beliebte Speisefischarten zu kultivieren (Schmenner, 2001; Pullin et al., 2009). Mit der Einführung des Granulatfutters Ende der 1950er Jahre wurde ein weiterer Meilenstein für ein modernes Anlagenmanagement in der Aquakultur gelegt, welcher sie weiter kommerzialisierte und unabhängiger von landwirtschaftlichen Nährstoffkreisläufen machte (Walker, 2007; Boyd & McNevin, 2014, S. 74). Fast parallel hierzu wurden die ersten Entwicklungen von modernen Kreislaufanlagen (engl. recirculating aquaculture system, RAS) in Japan getätigt, welche zum Ende des 20. Jh. technisch ausgereift waren und zu einer Verringerung des ökologischen Fußabdrucks von AQ-Systemen innerhalb dieses Technologiesegment beitrugen (Ahmed & Turchini, 2021). Moderne AQ-Systeme setzen sich heutzutage aus allen bekannten Typen der Entwicklungsgeschichte zusammen (Teichwirtschaft, Durchfluss-System, rezirkulierendes System,

Netzgehege und Muschelzuchten), wurden jedoch über die Jahrhunderte auf ein hohes Maß perfektioniert.

- **Moderne RAS-Anlagen**

Der Aufbau von modernen RAS-Anlagen setzt sich aus vier Grundkomponenten zusammen. Ein wesentliches Grundelement bildet ein Segment aus Haltungsbecken (1), die an eine mechanische (z. B. Trommelsiebfilter (2), Sedimentfilter (3)) sowie eine biologische Wasseraufbereitung (z. B. Trickling-Filter, Bewegbett-Filter (4)) angeschlossen sind (Abbildung 2). Darauf folgend schließt sich optimalerweise eine hygienische Aufbereitung (z. B. UV-Bestrahlung oder Ozonbehandlung (5)) der Aufbereitungskaskade an, die zudem den Rückfluss des Kreislaufwassers zu den Haltungsbecken gewährleistet. Die Komponenten der ersten Wasseraufbereitungsstufe (2-3) integrieren hierbei eine mechanische Aufbereitung von organischen und anorganischen

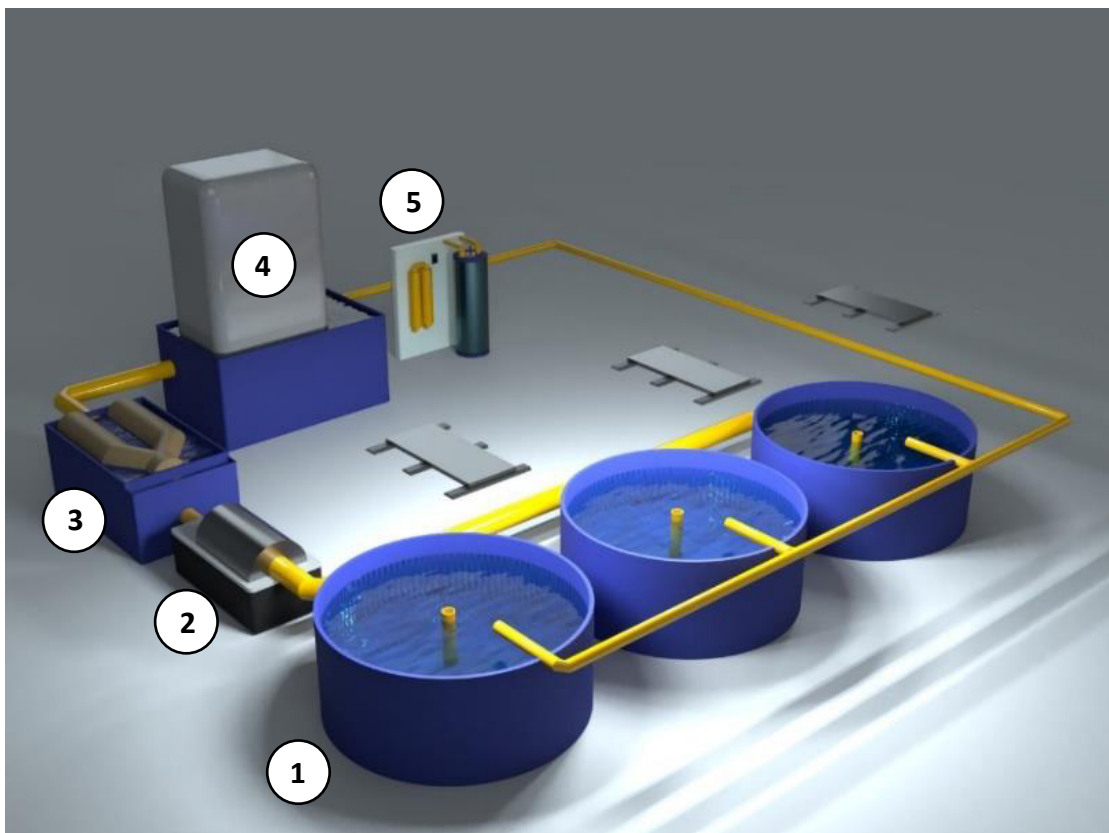


Abbildung 2: Konzept einer RAS-Aquakulturanlage. 1: Haltungsbecken mit Fischen, 2: Trommelsiebfilter, 3: Sedimentfilter, 4: Biologische Filtereinheit (Trickling-Filter), 5: UV-/O₃-Einheit.

Schwebstoffen aus dem Prozesswasser der Tierhaltung, welche diese (z. B. Fütterungsreste oder Faeces) aus dem System entfernen (Midilli et al., 2012; Badiola et al., 2018). In der zweiten Stufe (4) werden die im Wasser gelösten Bestandteile aus dem Stoffwechsel der Tiere und dem Futter durch Mikroorganismen verstoffwechselt und somit aus dem Wasser durch biologische Aufbereitung abgebaut. Nitrifizierende Bakterien (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Nitrospinas*), wandeln dabei das im Proteinstoffwechsel der Fische anfallende Ammoniak (NH₃) bzw. Ammonium (NH₄⁺) im Kreislaufwasser zu Nitrit (NO₂⁻) und schließlich zu Nitrat (NO₃⁻) durch Oxydation um (Lee et al., 2000; Dolomatov et al., 2011). Die mikrobielle Aktivität wird dabei maßgeblich durch den Futtereintrag und die physiko-chemischen Parameter (z. B. pH-Wert, Sauerstoffgehalt; Kapitel: 1.5.1; Physikalische Haltungsbedingungen) des Kreislaufwassers bestimmt. Unter

einer eingeschränkten Funktionalität dieses Prozesses kann es dabei zu einer Anreicherung für den Tierbestand toxischen Stickstoffspezies wie NO_2^- oder NH_4^+ im Prozesswasser kommen (Kapitel: 1.5.2; Chemische Haltungsbedingungen). Dies sollte durch eine routinierte Kontrolle der Anlagenfunktionalität nach Möglichkeit direkt unterbunden werden. Die abschließende Aufbereitung des zirkulierenden Prozesswassers erfolgt idealerweise nach den ersten beiden Aufbereitungsstufen durch eine Desinfektionsstufe (5). Je nach Systemanforderungen wird dabei entweder UV-C Licht oder Ozon-Gas eingesetzt, um die Anzahl wasserlebender Pathogene (z. B. Bakterien oder Pilzsporen) zu verringern (Gonçalves & Gagnon, 2011; Powell & Scolding, 2018; Xylem, 2021). Dieser technische Aufbau einer RAS-Anlage ermöglicht somit die kontrollierte Produktion von Fischen, Algen und Krebstieren bei vergleichsweise geringen Nährstoffemissionen in die Umwelt sowie einem deutlich reduzierten Wasserverbrauch im Vergleich zu konventionellen Durchflusssystemen (Popa et al., 2017; Moreno-Andrés et al., 2020).

1.3 Aquaponik: Eine synergetische Nutzung von Fisch und Pflanze

Die Idee, Fische und Pflanzen zusammen zu kultivieren, ist keine Errungenschaft der Moderne, sondern wurde bereits vor mehr als 1.700 Jahren auf überfluteten Reisfeldern in China praktiziert (Halwart et al., 2004, S. 1; Turcios & Papenbrock, 2014; Palm et al., 2018a). Weitere historische Aufzeichnungen belegen zudem die Bewirtschaftung sog. „Chinampas“, welche in der Azteken-Kultur zwischen 1150-1350 v. Chr. für die Fischzucht und die Kultivierung von Pflanzen genutzt wurden (Turcios & Papenbrock, 2014). Das Zeitalter der modernen Aquaponik (Aquap.) begann erst später, in den 1970er Jahren, durch die Entwicklung fortschrittlicher Anlagenmodelle (Naegel, 1977; Love et al., 2014). Das bekannteste System entstand dabei an der Universität der Virgin Islands in den USA (Rakocy, 1989). Mit der steigenden Bedeutung nachhaltiger sowie regionaler Produktion und integrierten Wertschöpfungsketten gewann die Technologie der Aquaponik in den letzten Jahren zunehmend an öffentlichem Interesse (Junge & Graber, 2014; Love et al., 2015a; Palm et al., 2018a). Unter dem Begriff der Aquaponik wurde ursprünglich ein ressourcenschonendes Produktionssystem verstanden, welches die Hydroponik mit dem substratlosen Anbau von Pflanzen in die Prozessstruktur der Aquakultur mit der Zucht von Fischen integrierte (Diver & Reinhart, 2000; Love et al., 2014; Love et al., 2015b; Love et al., 2015a; Rakocy et al., 2006). Mit zunehmender Entwicklung von Produktionsmöglichkeiten und Effizienz der Anlagen wurde diese Definition weiter an den Fortschritt dieser Technologie angepasst. Die Nomenklatur nach Palm et al. (2018, 2024) findet in der modernen Aquaponikforschung die breiteste Anwendung. Hier wird die Aquaponik als integriertes System zur Produktion von aquatischen Organismen beschrieben, bei der mehr als 50 % der Nährstoffe für das Pflanzenwachstum aus eigenen Kreislaufprodukten stammen, die z. B. bei der Fütterung der Zuchtfische anfallen (Abbildung 3). Ferner werden die Anwendungsbereiche der Aquaponik im engeren Sinne (*sensu stricto*, s. s.) und im weiteren Sinne (*sensu lato*, s. l.) unterschieden. Hierbei handelt es sich um eine Form der aquap. Pflanzenkultivierung, welche ohne Verwendung von Substraten (s. s.-System) auskommt oder diese für einen erfolgreichen Wuchs der Pflanzen beinhaltet (s. l.-System) (Palm et al., 2018a). Mit einem Zusammenschluss von modernen RAS-Anlagen und Pflanzenzuchten wird ein synergetischer Nutzen zwischen beiden Systemen durch eine Aufbereitung des nährstoffbelasteten Prozesswassers aus dem RAS-Systemkomplex durch die Pflanzenkultur hergestellt. Das Funktionsschema aquap. Anlagen basiert im Wesentlichen auf dem von modernen RAS-Systemen, jedoch wird den klassischen Wasseraufbereitungskomponenten (Kapitel: 1.2., Geschichte der Aquakultur und die Entstehung von modernen Kreislaufanlagen (RAS)) eine Pflanzenkultur zur weiteren Wasseraufbereitung (Abbau von Nährstoffbestandteilen über das Pflanzenwachstum) vor dem Rücklauf in das RAS-System hinzugefügt

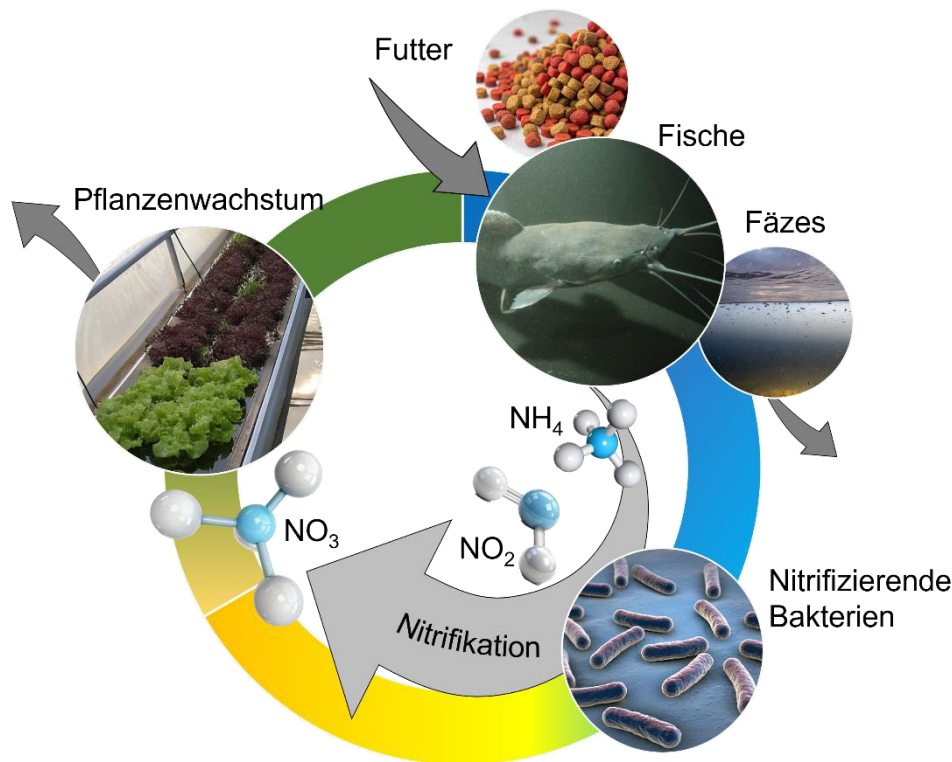


Abbildung 3: Das Aquaponik-Funktionsschema. Der primäre Nährstoffeintrag im System erfolgt über das zugeführte Fischfutter, das von den Fischen in Stoffwechselprodukte umgesetzt wird. Überreste wie Fäzes oder Futterreste werden regelmäßig aus dem System entfernt. Die von den Fischen ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte werden durch Bakterien in der Biofilterstufe der RAS-Anlage entlang des Nitrifikationsprozesses mineralisiert. Die dabei entstehenden Nährstoffe dienen den im Kreislaufwasser kultivierten Pflanzen u. a. als Grundlage für ihr Wachstum. Sowohl die Pflanzenkulturen als auch die Zuchtfische können nach einigen Wochen bis Monaten geerntet und durch neue, junge Kulturen ersetzt werden.

(Anhang 10.1.2). In dieser vierten Aufbereitungskomponente werden die durch den biologischen Vorfilter mineralisierten Stickstoffverbindungen (NO_2^{2-} NO_3^-), die aus anorganischen (NH_4^+) und organischen (Fäzes, Urin) Stoffwechselprodukten der Zuchtfische stammen, von den Wurzeln eingesetzter Kulturpflanzen für das eigene Wachstum zu einem großen Teil abgebaut (Eck et al., 2019; Losordo et al., 2000). In diesem Zusammenhang kommt den siedelnden Mikrobiota innerhalb einer RAS-Anlage eine zentrale Bedeutung zu, da ihre Stoffwechselaktivität innerhalb des Nitrifikationsprozesses maßgeblich die Gesundheit der eingesetzten Tier- und Pflanzenarten bestimmt (Joyce et al., 2019). In einem aquap. System kann der Bedarf an primären Nährstoffen (z. B. NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{2-} etc.) und an Wasser im Wesentlichen durch die Zusammensetzung des Fischfutters (Kapitel: 1.5; Äußere Haltungsbedingungen: Management und Bedeutung für die Fischzucht) sowie mit dem Anschluss an das Kreislaufwasser eines AQ-System bis zu 80 % abgedeckt werden (Lennard, 2015). Für eine optimale Nährstoffversorgung der Pflanzen (je nach Art) ist jedoch eine selektive Zudüngung bestimmter Spurennährstoffe erforderlich (Kotzen & Appelbaum, 2010; Tyson et al., 2012; Þórarinsdóttir et al., 2015; Ru et al., 2017; Palm et al., 2018a; Strauch et al., 2018; Kapitel: 1.5; Äußere Haltungsbedingungen: Management und Bedeutung für die Fischzucht). Da der Nährstoffabbau durch das Pflanzenwachstum nicht für alle Nährstofffraktionen gleichmäßig erfolgt, wird – in Abhängigkeit von der Größe der Anlage – dennoch ein periodischer Wasseraustausch empfohlen, um Nährstoffspitzen im Gesamtsystem zu vermeiden. Im Allgemeinen sind den Möglichkeiten einer kombinierten Produktion von Fischen und Pflanzen hinsichtlich der Artenzusammenstellung nur wenige

Einschränkungen gesetzt. Häufig werden jedoch bestimmte Fisch- und Pflanzenarten zusammen kultiviert, da sich ihre gemeinsamen physikalisch-chemischen Anforderungen an das Haltungswasser einfacher und ökonomischer bewirtschaften lassen (Palm et al., 2014; Knaus & Palm, 2017a, 2017b).

1.4 Management von Fischen in Aquakulturanlagen

1.4.1 Moderne Haltungsbedingungen in der Fischzucht

Mit der Entwicklung der Aquakultur über die Jahrtausende entwickelten sich auch Präferenzen hinsichtlich der Haltung bestimmter Fischarten und ihrer Kultursysteme. Beispiele hierfür lassen sich in den heimischen Karpfen- und Saiblingszuchten wiederfinden, wo Teiche und Fließgewässer für die Kulturen vorrangig verwendet wurden, da sie die natürlichen Lebensräume abbildeten und den Anforderungen der artspezifischen Haltungsbedingungen bestmöglich entsprachen (Conte, 2004; Bozoglu et al., 2006; Rahman, 2015). Für die Kultivierung nicht heimischer Arten (aus Asien, Afrika etc.), welche inzwischen auch in Deutschland kultiviert werden, stellt die Aufrechterhaltung bestimmter Umweltbedingungen in einer AQ-Anlage eine besondere Herausforderung dar. Hierfür werden heutzutage RAS-Anlagen eingesetzt, die eine Kontrolle gängiger Umweltparameter einer Fischzucht erleichtern und somit der Haltung nicht heimischer Arten oder Arten mit besonderen Bedürfnissen ermöglichen (Ahmed & Turchini, 2021). In aquap. RAS-Anlagen, in denen die Stoffwechselprodukte von Zuchtfischen für das Wachstum von Kulturpflanzen verwendet werden, setzen sich diese Präferenzen an das verwendete Prozesswasser weiter fort. Zudem entwickelten sich in der Aquaponik gewisse Vorlieben hinsichtlich der Verwendung bestimmter Fisch- und Pflanzenarten zur Optimierung der synergetischen Effekte zwischen beiden Kultursystemen (Martan, 2008; Knaus & Palm, 2017b; Baganz et al., 2022). Die am häufigsten kultivierten Fischarten in der Aquaponik sind Vertreter der Tierordnungen (*Cichliiformes*, *Cypriniformes* und *Siluriformes*), wozu auch der Afr. Raubwels (*Clarias gariepinus*) zählt (Pinho et al., 2021; Baganz et al., 2022). Die Spezies dieser Ordnungen werden dann in den Fisch-Kulturbecken einer Aquaponikanlage gehalten, um das Prozesswasser der Anlage mit Nährstoffen anzureichern. Parallel dazu können in separaten Pflanzbecken verschiedene Salat- und Gemüsesorten sowie diverse Kräuter im Prozesswasser der Anlage kultiviert werden (Rakocy et al., 2006).

Mit dem technologischen Fortschritt in der modernen Aquakultur wurden die Haltungsbedingungen in den Anlagen immer mehr den Bedürfnissen der Kulturtiere angenähert (Bostock et al., 2010; Wang et al., 2021). Die Bedeutung dieser Annäherung wird besonders vor dem Hintergrund deutlich, wenn man berücksichtigt, dass nahezu alle aquatischen Organismen wechselwarm (poikilotherm/ ektotherm) sind und ihre Körpertemperatur – sowie essenzielle physiologische Prozesse – unmittelbar von der Wassertemperatur abhängen. Folglich müssen sowohl der Typ der Aquakulturanlage als auch die Temperaturparameter so gewählt werden, dass die resultierenden Prozesswasserbedingungen den jeweils optimalen Haltungsanforderungen des Zuchtfischbestandes entsprechen. Da sich Faktoren wie die Gesundheit und das Wohl des Fischbestandes auch auf die Lebensmittelqualität und ihre Sicherheit auswirken, spielen die richtigen Haltungsbedingungen heutzutage für Zuchtbetriebe mit einer industriellen wie kommerziellen Ausrichtung eine größere Rolle denn je. Grundlegende Anforderungen hierfür werden in der BRD über das Tierschutzgesetz (TierSchG; § 2 (Haltungsnorm), § 11 (8) (Eigenkontrolle) und § 16 (weitere Vorschriften)) zur Festlegung allgemeiner Anforderungen an die Haltungsbedingungen von landwirtschaftlich genutzten Wirbeltieren festgelegt. Dementsprechend sind AQ-Betriebe – wie auch Bauernhöfe – in Deutschland dazu verpflichtet, ihre Tiere

artgerecht zu ernähren, zu pflegen und verhaltensgerecht zu halten. Dies beinhaltet eine Unterbringung der Tiere, welche ihren Bewegungsraum nicht derart einschränkt, dass ihnen Schmerzen, Schäden oder vermeidbare Leiden entstehen. Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen an die Haltungsbedingungen verschiedener Arten konnten in Deutschland bislang keine konkreten gesetzlichen Vorschriften zur Haltung von Fischen oder Wirbellosen verfasst werden. Der Gesetzgeber appelliert daher an die, durch die in § 11 (8) TierSchG dargelegte Eigenkontrollpflicht zur Einhaltung der Sicherstellung des Tierschutzes (gemäß § 2 TierSchG). Hilfestellungen (Leitfäden) für die verpflichtende Eigenkontrolle werden unterstützend von beratenden Organen wie dem Verband Deutscher Fischereiverwaltungsbeamter und Fischereiwissenschaftler e. V. (VDFF) bereitgestellt (VDFF, Baer et al., 2007). Für die Produktion von AQ-Produkten gewinnen neben Tierschutz und Tiergesundheit auch Anforderungen wie nachhaltige Produktion (z. B. Emissionsneutralität) und die Umsetzung von Kreislaufwirtschaftskonzepten zunehmend an Bedeutung und werden voraussichtlich auch künftig feste Bestandteile der AQ-Produktion sein (Konstantinidis et al., 2021; Chen et al., 2023; Xu et al., 2023).

1.4.2 Die Besatzdichte und ihr Einfluss auf die Entwicklung von Zuchtfischen

Einer der einflussstärksten Faktoren in der Haltung von Tieren in AQ-Anlagen ist die Besatzdichte. Sie hat direkten Einfluss auf das Wachstum sowie das Stressverhalten und damit auf die Krankheitsanfälligkeit der Tiere und bestimmt somit maßgeblich über den ökonomischen Erfolg einer Produktion (Ashley, 2007; Van De Nieuwegiessen et al., 2009; Ananda Raja & Jithendran, 2015). Die Besatzdichte in einer AQ-Anlage wird üblicherweise in kg/m³ für freischwimmende oder in kg/m² für am Grund lebende Organismen angegeben, und beschreibt, wie viel Biomasse pro Wasservolumen in einem Zuchtbecken gehalten wird (Samocha et al., 1993; Rahmatullah et al., 2010; Kaya et al., 2020). Darüber hinaus unterscheidet man extensive, semi-intensive und intensive Besatzdichten, die je nach Tierart und betriebener Haltungsform Anwendung finden (Ammar, 2009; Barron et al., 2013; Pasch, 2022, S. 107). Die Definitionen des Umfangs ihrer jeweiligen Besatzdichte wurden für RAS-Raubwels-Aquakulturen von Pasch (2022) tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 1).

Tabelle 1: Besatzdichtendefinition nach Pasch (2022). Besatzdichten für *C. gariepinus* in RAS-Anlagen.

Max. Besatzdichte (kg/m ³)	Max. Besatzdichte (Fische/m ³)	Bezeichnung	Anwendung
< 50	< 33	Extensiv	Heimische RAS und Aquaponik für Eigenbedarf
50 bis < 150	33 bis < 100	Semi-Intensiv	Heimische RAS und Aquaponik mit Gewinnerzielungsabsicht bezüglich Pflanzen
150 bis < 300	100 bis < 200	Intensiv	Semi-kommerzielle RAS
300 bis < 500	200 bis < 333	Hochintensiv	Kommerzielle RAS
≥ 500	≥ 333	Super Intensiv	Kommerzielle RAS mit erfahre- nem Personal und regelmäßi- gen Kontrollen

Um für die jeweilige Tierart die bestmögliche Besatzdichteneinstellung zu treffen, kommen bei ihrer Festlegung dem Sozialverhalten der verwendeten Tierart (Schwarm/Einzelgänger), ihrem Entwicklungsgrad (Larven, Jungtiere, Adulte) und der Tragfähigkeit (Systemkapazität als

Belastungsgrenze für Wasseraufbereitung, Belüftung, Filtration etc.) des eingesetzten Produktionssystems eine besondere Bedeutung zu (Gall & Bakar, 1999; Ashley, 2007; Mugwanya et al., 2022). Zudem können Umwelteinflüsse wie Jahres-, Regen- und Trockenzeiten einen Einfluss auf das besatzdichtenabhängige Verhalten der Tiere nehmen (Oppedal et al., 2011; Villanueva et al., 2013). Liegt die gewählte Besatzdichte außerhalb des optimalen Bereiches eines Tierbesatzes, kann sich dies nachteilig auf die Gesundheit des Tierbestands, die Produktqualität der gezüchteten Tiere und letztendlich auf den Wert der produzierten Charge bzw. die Betriebsökonomie auswirken (Ashley, 2007; Van De Nieuwegiessen et al., 2008, 2009; Baldwin (2011); Saraiva et al., 2022). Eine Anpassung der spezifischen Besatzdichte ist daher mit in das Bewirtschaftungskonzept einer AQ-Anlage zu integrieren. Somit lässt sich die maximale Tragfähigkeit moderner AQ-Systeme bei Bedarf durch die Zufuhr von reinem (techn.) Sauerstoff in das Prozesswasser gezielt erhöhen. Auf diese Weise lässt sich ein Besatz oberhalb der natürlichen Tragfähigkeitsgrenze eines AQ-Systems realisieren, was einen wesentlichen Vorteil gegenüber klassischen Teichanlagen darstellt (Colt & Watten, 1988; Mallya, 2007, S. 17; Stigebrandt, 2011). Weil die Besatzdichte einer Fischzucht auch über die Menge des Futtereintrags in ein System bestimmt, gerieten größere Anlagen in der Vergangenheit oft in den Fokus negativer Schlagzeilen. So wurden z. B. neben Netzgehegen freischwimmender AQ-Anlagen mit einer hohen Tragfähigkeit erhöhte Nährstoffemissionen in der Umwelt und ein stärkerer Parasitenbefall im Fischbestand nachgewiesen (Folke & Kautsky, 1992; Schwitzguébel & Wang, 2007; Davenport, 2003, S. 24). Eine Änderung dieser Entwicklung wurde von der Europäischen Kommission im Jahr 2009 durch die Verordnung (EG) Nr. 710/2009 vom 5. August 2009 – später ersetzt durch die Durchführungsverordnung (EU) 2021/1165 vom 15. Juli 2021 – eingeleitet. Diese legte verbindliche Bestimmungen und Richtlinien zum maximalen Besatz in der ökologisch-biologischen Aquakultur sowie zum Umwelt- und Tierschutz fest. Die Verordnung greift Empfehlungen zu den Besatzdichten der jeweiligen Tierart gemäß den artspezifischen Bedürfnissen auf und regelt deren Kontrolle mittels Durchführungsrechtsakten (Artikel 15, Absatz 3). So wird das Wohlbefinden von AQ-Organismen und die Einstellung kritischer Faktoren wie der Besatzdichte und der Zustand der Tiere (Verletzungen, Wachstumsraten, Verhalten und allgemeiner Gesundheitszustand) z. B. durch die regelmäßige Kontrolle der Wasserqualität überwacht (EU-Verordnung 2018/848 vom 30.05.2018).

1.4.3 Fütterungsmanagement in der Aquakultur

Ein zentraler Trend in der weltweiten Aquakultur stellt die zunehmende Intensivierung der Produktionsmethoden dar (Bostock et al., 2010; Longo et al., 2013). Diese Entwicklung geht maßgeblich auf eine verbesserte Flächennutzung insbesondere durch technische Fortschritte in der Haltungstechnik zurück. Begleitet wird dieser Fortschritt durch moderne Verfahren der Wasserqualitätskontrolle, optimierte Futtermittel, Krankheitsprävention und Zuchtoptimierung (Goddard, 2012, S. 1). In einer intensiven Kultur wird die Dichte der Fische nicht mehr durch die Verfügbarkeit von Futtermitteln begrenzt, sondern wird durch die Toleranz der Arten und ihre Fähigkeit, unter höheren Besatzdichten zu wachsen, sowie durch eine Aufrechterhaltung der Wasserqualität bestimmt (Goddard, 2012, S. 1). In intensiveren Zuchtanlagen resultiert daraus eine größere oder vollständige Abhängigkeit bezüglich der Verwendung von ernährungsphysiologisch vollständig formulierten Futtermitteln für den Fischbesatz. Da sich die Kosten für Futtermittel typischerweise über die Investitionskosten eines Aquakultursystems berechnen und häufig einen nicht zu unterschätzenden Anteil an den Produktionskosten ausmachen (Rana et al., 2009, S. 63; Pasch, 2022, S. 101), leiten sich wesentliche Anforderungseigenschaften formulierter Futtermittel von einer optimierten Produktion in der Aquakultur ab. So sollten

eingesetzte Futtermittel keinen Schwankungen in ihrer Verfügbarkeit auf dem Markt, ihrer Beschaffenheit oder Qualität unterliegen (Jobling, 2016). Daher werden heutzutage diverse pelletierte Mischfuttermittel für eine breite Palette von AQ-relevanten Fisch- und Garnelenarten angeboten und eingesetzt. Die Zusammensetzung und Korngröße dieser Futtermittel werden von den Herstellern jeweils genau auf die Tierart, das Alter, die Haltung und den jeweiligen Produktionsschritt einer Charge für ein optimales Ergebnis abgestimmt. Die Vormischung (Premix) bildet ein Gemisch aus verschiedenen Zusätzen, z. B. Vitaminen und additiven Spurenelementen (Gonzalez & Allan, 2007, S. 7). Nach Bedarf können aber auch synthetische Aminosäuren, Arzneimittel oder Verdünnungs- und Trägermittel hinzugefügt werden. Das durch die Weiterverarbeitung dieser Vormischung entstehende Mischfutter orientiert sich dabei an den natürlichen Nahrungsansprüchen der Tiere (omnivor, piscivor, karnivor, herbivor) sowie ihrer jeweiligen Ontogenese (De Silva & Anderson, 1994, S. 249; Jobling, 2016; Craig et al., 2017). Die Futterumwandlungsrate (FCR) eines definierten Futtermittels beschreibt dabei das Verhältnis zwischen der aufgenommenen Futtermittelmenge und dem daraus resultierenden Wachstum eines Zuchtfisches. Bei optimaler Futterverwertung sinkt der FCR-Wert, was auf ein verbessertes Wachstum hinweist (Mallay, 2007, S. 17). So erreicht ein Zuchtfisch, welcher zur Erreichung seines Endgewichts von 1 kg mit nur 800 g Futter gefüttert wurde, einen FCR-Wert von 0,8. Bedeutende Bestandteile dieser Tierfuttermittel bilden hierbei – neben weiteren wichtigen Anteilen – das Mehl und Öl von Fischen aus dem Wild- und Beifang der Fischerei (Naylor et al., 2009). Diese werden auf den Weltmärkten zu hohen Preisen gehandelt und konnten bislang trotz Verbesserungen der FCR-Werte karnivorer Fische sowie teilweiser Substitution durch pflanzliche oder alternative Proteinquellen (z. B. Soja, Insekten) nicht vollständig aus den Futtermischungen verdrängt werden (Naylor et al., 2009; FAO, 2022, S. 101). Dabei wird zur Herstellung von rund 1 kg Fischmehl 4,4 - 5 kg Fischrohmaterial benötigt, mit einer parallelen Ausbeute an Fischöl von etwa 5 % (Péron et al., 2010). So entspricht ein FCR-Wert von 1,3 eines Trockenfutters für einen Zuchtlachs (*Salmo salar*) einer Menge von etwa 5 kg verarbeiteten Fisch pro kg erwirtschafteten Zuchtfisch (Naylor et al., 2009). Dieses Verhältnis wird in der Aquakultur von der sog. FIFO-Relation („Fish-In-Fish-Out“-Relation) abgebildet und ist ein Maß für die Effizienz der Fischproteinproduktion (Hubold & Klepper, 2013). Dabei kommt der Bestimmung repräsentativer FCRs eines kommerziellen Mischfutters eine besondere Bedeutung zu, welche letztendlich über den FIFO-Wert einer Zuchtfischart bestimmt (Naylor et al., 2009). Weltweit nehmen jedoch karnivore Arten in der AQ-Produktion nur einen geringen Prozentanteil ein (Hubold & Klepper, 2013). Die größten globalen Fischbestände bilden Vertreter omnivorer oder herbivorer Fischarten (Tilapia, Karpfen, Welse etc.), welche FIFO-Relationen zwischen 0,2 - 0,6 besitzen (FAO/NACA, 2012). Dank dieses Verhältnisses wird für die weltweite, futterbasierte Aquakultur ein mittlerer FIFO-Relationswert von 0,7 (Tacon & Metian, 2008) bzw. 0,63 (Naylor et al., 2009) angegeben, was einer Nettoproduktion von 1,4 bis 1,6 kg Fisch pro kg verwendetem Wildfisch entspricht (Hubold & Klepper, 2013). Für eine zukünftige ressourcenschonendere und wirtschaftliche Produktion von Kulturfischen sind daher eine weitere Effizienzsteigerung der Futtermittel in ihren FCRs und die Entwicklung weiterer Substitutionsmöglichkeiten für die Bestandteile des Fischmehls und Öls erforderlich.

1.4.4 Hygienische Herausforderungen in Aquakulturanlagen

Mit der Veränderung der klimatischen Bedingungen und der damit verbundenen Ausbreitung von Verbreitungszonen verschiedenster Krankheitserreger beeinflusst der Klimawandel auch Ausbrüche von AQ-relevanten Erregern auf der Welt (Chu, 1996; Harvell et al., 1999). Zudem sorgt eine unvorhersehbare Entwicklung auf den Weltmärkten und im internationalen

Handelsumfeld für eine sich schnell verändernde Gefahrensituation von Seuchen aufgrund von Globalisierung, steigender AQ-Produktion und mikrobieller Anpassung (Subasinghe et al., 2004; FAO et al., 2006). Als ein stetig wachsender landwirtschaftlicher Zweig mit hoher Nachfrage auf den Weltmärkten wird mit einer zunehmenden Intensivierung der globalen Aquakultur gerechnet (Bostock et al., 2010; Longo et al., 2013), was allerdings auch Risiken mit sich bringt. Oft brechen in AQ-Betrieben Tierseuchen aus, da die Haltungs- und Umweltbedingungen für die Tiere nicht mehr adäquat sind (Überfüllung, Temperaturschwankungen, unzureichend gelöster Sauerstoff, übermäßiger Umgang, unangemessenes Futter etc.; Meyer, 1991). Der resultierende Stress und eine daraus hervorgehende Immunschwächung können dabei einen lokalen Ausbruch begünstigen (Bondad-Reantaso et al., 2005). Durch eine artgerechte Haltung und eine optimale Prophylaxe kann das Risiko eines Ausbruches oder einer Einschleppung in ein geschlossenes AQ-System minimiert werden (Oliva-Teles, 2012; Diana et al., 2013). Daher stellt das Hygienemanagement in einer AQ-Anlage einen wichtigen Aspekt für den Tierschutz, aber auch für die Wirtschaftlichkeit eines Unternehmens dar. Das Gesundheitsmanagement für aquatische Organismen hat erst in jüngster Zeit in vielen AQ-Regionen der Welt eine hohe Priorität erlangt. Viele Länder (z. B. Asien) begannen langsam mit der Modernisierung ihrer Laboreinrichtungen sowie mit der Verbesserung von Kontroll- und Therapiestrategien, um den Seuchenschutz in der inländischen Aquakultur präventiv zu stärken und langfristig zu verbessern, nachdem es zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten und negativen Umweltauswirkungen in den frühen 1990er Jahren gekommen war (Bondad-Reantaso et al., 2005). Zudem wurden Risikoanalysen für wirtschaftlich relevante Tierarten zusammen mit Notfallplänen für die Betriebe im Seuchenfall ausgearbeitet (Rodgers, 2001; Arthur et al., 2004). Leider blieben diese Fortschritte hinter denen eines sich rasant entwickelnden Technologiefortschritts und steigender Produktionsvolumen zurück und die Einführung einer international gültigen Norm für Hygienestandards in AQ-Einrichtungen blieb bislang aus (Focardi et al., 2005). Somit gewannen auch grenzüberschreitende hochansteckende Wassertierpathogene/-krankheiten (TAAPs/TAADs) infolge des Ausbaus des AQ-Produktionssektors in der Weltwirtschaft weiter an Bedeutung (Sebastian, 2009; Kumar et al., 2013; Giri & SAARC Agriculture Centre, 2018). Derzeit werden rund 35 Erregerarten von Fischen, Weich- und Krustentieren vom internationalen Tierseuchenamt (OIE) aufgelistet, von denen eine potenzielle Gefahr sowohl für die Tier- als auch die menschliche Gesundheit ausgeht (Bondad-Reantaso et al., 2005; Rodgers et al., 2011; Oidtmann et al., 2013). Zu diesen zählen auch in Deutschland vorkommende, nicht exotische Fischseuchen wie die virale hämorrhagische Septikämie (VHS), die infektiöse hämatopoetische Nekrose (IHN), die infektiöse Lachsanämie (ISA), die Koi-Herpesvirus-Infektion (KHV-I) und die Weißpünktchenkrankheit, sog. „White Spot Disease“ (WSD), die auch in der EU einer strengen Kontrolle unterliegen (EU-Richtlinie 91/67/EWG vom 28.01.1991 sowie vom 19.02.1991; EU-Durchführungsbeschluss 2015/1554 vom 11.09.2015). Allerdings kann je nach Anlagentyp das Gefährdungspotenzial eines Erregers höher oder niedriger eingestuft werden. Geschlossene Systeme (z. B. RAS) können im Gegensatz zu offenen Systemen (z. B. Teich oder Netzgehege), die immer einem Austausch mit der Umwelt unterliegen, vollständig kontrolliert werden (Munang'andu, 2016; Palm & Bischoff, 2016; Pintado et al., 2023). Vorteile einer verbesserten Biosicherheit in geschlossenen RAS-Anlagen sind z. B. der Schutz der eigenen Ressourcen, Lebensmittelsicherheit, Sicherstellung von Handels- und Verbraucherpräferenzen für hochwertige und sichere Produkte, Rentabilität der Produktion und eine Resilienz gegenüber kleineren Hygieneproblemen (Pruder, 2004; Bondad-Reantaso et al., 2005; Hine et al., 2010). Mit einem betrieblich an die eigene Produktion stark angepassten Hygienemanagement können die eigenen Eintragsvektoren potenzieller Erreger in die Produktionsanlagen in den Fokus gerückt und prophylaktisch als auch bei akuten Ausbrüchen gezielt bekämpft werden. Hierbei

hat sich ein in sich geschlossenes Hygieneschrankenmodell zusammen mit einem abgestimmten Hygienemanagement in AQ-Produktionsstätten (Futterhygiene, Wasserhygiene, Ausrüstungshygiene, Schulungen, Reduzierung von Umweltstressoren, Verschrecken von Wildtieren und Immunisierung) bewährt (Meyer, 1991; Yanong & Erlacher-Reid, 2012; Palić et al., 2015). Die Wahl geeigneter Desinfektionsmittel bildet ebenso wie routinierte Reinigungen die Grundlage für ein gutes Gesundheitsmanagement der Anlage wie auch des Tierbestands. In der EU bzw. in der BRD werden bestimmte Auflagen für den Betrieb einer Fischzucht über die Umsetzung der EU-Richtlinien 91/67/EWG vom 28.01.1991 und 93/53/EWG vom 19.07.1993 (nachfolgende Fassung: EU-Verordnung 2016/429 vom 9.03.2016) bzw. national über die Fischseuchenverordnung (FischSeuchV), die Fischhygieneverordnung (FischHV) und das Tiergesundheitsgesetz (TierGesG) der Bundesregierung geregelt. Ein Betreiber muss so in einem Genehmigungsverfahren nachweisen können, dass er für seinen Betrieb Biosicherheitsmaßnahmen vorhält (§4 Abs.1 Nr.1 Buchst. A FischSeuchV) und sich sachkundig über potenzielle Krankheitserreger gemacht hat (§ 3 TierGesG). Eine Notfallplanung für den Seuchenfall ist ebenso auszuarbeiten und zu veröffentlichen. Kommt es zum Ausbruch oder wird bei einer verpflichtenden jährlichen Kontrolle ein gelistetes Pathogen festgestellt, kann ein Betrieb nur nach einer Hygienisierung und durch eine Freigabe eines zuständigen Amtsveterinärs wieder geöffnet werden (EU-Verordnung 2016/429 vom 31.03.2016).

1.4.5 Management von Zuchtfischbeständen in RAS-Aquakulturanlagen

Der Betrieb und das Management einer RAS-Aquakulturanlage erfordern ein fundiertes Verständnis der einzelnen integrierten Prozesse sowie des gesamten Produktionszyklus und setzen eine sorgfältige Planung der Arbeitsschritte voraus. Neben den technischen Abläufen sind die Tierbestandsverwaltung und die Produktionsplanung weitere essenzielle Faktoren für den Betrieb einer RAS-Anlage (Bostock, 2011; Emmanuel et al., 2014; Khanjani & Sharifinia, 2020). Der RAS-Anlagenmanager muss sich daher während des gesamten Betriebs einer Anlage auf strategische als auch auf betriebliche Entscheidungen konzentrieren, um ein optimales Ergebnis zu erzielen und Störungen zu vermeiden. Zu den strategischen Entscheidungen gehören z. B. das zu bewirtschaftende Wasservolumen für die Fischzucht, das Design und das Layout der Zuchtbecken, Art und Größe der biologischen Filter, zu haltende Fischart sowie Fütterungstechnik und -häufigkeit (Elalouf et al., 2018; Kapitel: 1.2, Geschichte der Aquakultur und die Entstehung von modernen Kreislaufanlagen (RAS); 1.4.1, Moderne Haltungsbedingungen in der Fischzucht; 1.4.3, Fütterungsmanagement in der Aquakultur; 1.5.2, Chemische Haltungsbedingungen). Diese strategischen Entscheidungen richten sich vor allem nach der Marktnachfrage der erzeugten Produkte, ihrem Verkaufspreis und dem möglichen Intensitätsgrad (max. Tragfähigkeit) der Anlage. Demgegenüber stehen betriebliche Entscheidungen wie die Art und Größe der zu vermarktenden Tiere, Sensibilität und Körpergröße des Jungfischbesatzes, die Größe einer Charge, die einzuhaltenden Besatzdichten sowie die Häufigkeiten der Sortierungen und der Reinigungen (Kapitel: 1.4.2, Die Besatzdichte und ihr Einfluss auf die Entwicklung von Zuchtfischen; 1.4.4, Hygienische Herausforderungen in Aquakulturanlagen; 1.5.2, Chemische Haltungsbedingungen). Genau wie bei jeder anderen industriellen Produktionsanlage sind bei einer RAS-Anlage die täglichen Entscheidungen auf der Betriebsebene eng mit den strategischen Entscheidungen des Konzepts verknüpft. Daher müssen bei jeder Entscheidung sowohl systemrelevante biologische als auch wirtschaftliche Faktoren und ihre Auswirkungen auf den Produktionsprozess mitberücksichtigt werden (Elalouf et al., 2018). Für die Planung von Abläufen in RAS-Anlagen wurden bereits viele unterschiedliche Szenarien und Modelle vorgeschlagen. Planungsmethoden auf Grundlage von Tabellenkalkulation (Losordo et al., 2000) sowie Modelle,

die auf einer Warteschlangentheorie basierten (Halachmi, 2007), wurden bereits für die Planung und Auslegung für die Speisefischproduktion in der Vergangenheit erarbeitet und halfen bei der Umsetzung von Produktionsschritten. Weitere Optimierungsmodelle fügten später wichtige Betriebsparameter wie mikrobielle Ressourcen (Brown, 2013), Sauerstoffversorgung (Seginer & Mozes, 2012) und wechselnde Besatzdichten (Villanueva et al., 2013) über eine Produktionsstrecke hinzu. Derartige Simulationsmodelle integrierten jedoch oft nur biologisch-technische Aspekte eines RAS-Anlagenmanagements und vernachlässigten das Betriebsmanagement. Eines der ersten Modelle zur Entscheidungsunterstützung in RAS-Anlagen wurde von Ernst et al. (2000) ausgearbeitet, in dem physikalische, chemische und biologische Prozesse in einer Managementplanung integriert wurden. Moderne Rechenmodelle, sog. „Decision Support Tools“, erlauben die Berechnung einer Vielzahl von produktionsrelevanten Faktoren und unterstützen den Anlagenmanager bei wichtigen Planungsschritten und strategisch-betriebsrelevanten Entscheidungsfragen (InnoAquaTech, 2023). So eignet sich z. B. das Managementmodell nach dem sog. „Batch-Prinzip“ vor allem für kleinere industrielle AQ-Anlagen, in denen kleinere Chargen von Tieren gleichen Alters zeitgleich aufgezogen werden. Mit dem Abfischen einer Charge fällt hier gleichzeitig auch die mikrobiotische Aktivität innerhalb eines Systems ab, sodass ein Neubesatz sorgfältig geplant werden sollte. Ein weiteres Modell stellt die sog. „staggered production“ für größere Industrieanlagen dar. Hierbei werden die Besatzbecken einer Anlage in Segmente untergliedert, die zusammen eine Produktionsstrecke verschiedener Alters- oder aber Gewichtsstufen des Fischbestandes abbilden (Rakocy et al., 2010; Al-Hafedh et al., 2008; Tidwell, 2012, S. 323; Calone et al., 2019). Diese Art des Anlagenmanagements erlaubt ein ständiges, einheitliches Produktionsvolumen, da die Biofilterkapazität zur Haltung des Produktionsvolumens aufrechterhalten wird und es nicht zu einem Zusammenbruch der mikrobiotischen Populationen durch Schwankungen im Anlagenbesatz kommt.

1.5 Äußere Haltungsbedingungen: Management und Bedeutung für die Fischzucht

Oft hängt der Erfolg einer AQ-Produktion von einem optimalen Umfeld für die verwendeten Kulturorganismen ab, sodass ein schnelles Wachstum der Tiere bei gleichzeitig geringen Kosten und geringem Ressourcenverbrauch angestrebt wird. Neben weiteren physikalischen Parametern beeinflusst die Wasserqualität diesen Zusammenhang direkt und wird somit als ein wichtiger Faktor für die Wirtschaftlichkeit eines AQ-Unternehmens verfolgt. Die Wasserqualität setzt sich in ihrer Gesamtheit aus verschiedenen physikalischen, chemischen und biologischen Parametern zusammen, die gemeinsam in unterschiedlichen Maßen und Abhängigkeiten über das Wachstum und das Wohlergehen von Kulturorganismen entscheiden (Stigebrandt et al., 2004; Mallya, 2007; Tolentino et al., 2021).

1.5.1 Physikalische Haltungsbedingungen

- **Temperatur**

Die Wassertemperatur ist ein bedeutender physikalischer Parameter für aquatisches Leben (Poikilothermie, s.o.). Damit beeinflusst das eingestellte Temperaturumfeld die biochemischen Prozesse, Stoffwechselraten und somit auch letztendlich das Wachstum der Tiere. Zudem werden auch chemische Reaktionen im Wasserkörper im hohen Maße durch die Temperatur reguliert und bestimmt. Weitere wichtige Parameter, wie z. B. die Sauerstoffsättigung, hängen darüber hinaus direkt von der Wassertemperatur und dem Umgebungsdruck ab (Jaynes & Rogowski, 1983). Suboptimale Temperaturen können in der Fischhaltung zu einer verminderten

Futteraufnahme/-verwertung (Timmons et al., 2018) oder zu Veränderungen des Verhaltens sowie Stressreaktionen führen (Drake et al., 2010; Lindholm-Lehto, 2023), was sich negativ auf die Entwicklung und die Gesundheit des Tierbestandes auswirken kann. Auch kann die Toleranz gegenüber unterschiedlichen Temperaturen je nach Art, Alter und Größe unterschiedlich sein oder sich mit der Zeit verändern (Timmons et al., 2018). Aufgrund dieser besonderen Anforderungen werden AQ-Anlagen gezielt auf die Temperaturanforderungen des Tierbestandes eingestellt und lassen sich nach den Präferenzen der Tiere in drei Kategorien nach Timmons et al. (2018) einteilen: Anlagen mit Kaltwasser ($< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$), gekühltem Wasser ($15\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$) und Warmwasser ($> 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), die mit den jeweils entsprechenden Kulturorganismen betrieben werden.

- **pH-Wert**

Ein wichtiger chemischer Parameter für die Charakterisierung aquatischer Lebensräume und der allgemeinen Wasserqualität ist der pH-Wert. Sein Wert wird durch die Konzentration (Konz.) von freien Protonen (H^+) und Oxonium-Ionen (H_3O^+) bestimmt und beschreibt den relativen Säuregehalt einer wässrigen Lösung auf einer Skala von 1 bis 14 (Ulonska, 1999). Viele aquatische Tierarten bevorzugen eine Wasserqualität mit einem neutralen (pH 7) pH-Wert (*C. gariepinus* (Ndubuisi et al., 2015); *Cyprinus capio* (Heydarnejad, 2012)). Jedoch können auch einige Tierarten, je nach Herkunftsort, leicht alkalische (pH 7-9) pH-Werte bevorzugen (*Cichlidae*, Takahashi-Kariyazono et al., 2017; *Oreochromis sp.*; Ross, 2000; Alsaïd et al., 2013). Der pH-Wert spielt außerdem für die mikrobielle Umwandlung von verschiedenen Stickstoffverbindungen (Nitrifikation) im Biofilter einer RAS-Anlage eine wichtige Rolle und benötigt hierfür einen pH-Wert (7-9 pH) im neutralen bis leicht basischen Bereich (Losordo et al., 2000; Rakocy et al., 2016; Goddek et al., 2016). Im Gegensatz zu den meisten in der Aquakultur verwendeten Fischarten bevorzugen Kulturpflanzen in aquap. Anlagen jedoch leicht saure pH-Werte (5,8-6,2 pH), da essenzielle Nährstoffe (Mikronährstoff- und Phosphorlöslichkeit) in diesem Bereich besser verfügbar vorliegen und aufgenommen werden können (Cerozi & Fitzsimmons, 2016; Yep & Zheng, 2019). Jedoch kann ein zu niedriger pH-Wert u. U. zu einer Korrosion der in Kreislaufanlagen verbauten Rohrleitungen oder der in ihnen abgesetzten Rückstände führen, was sich später durch eine Abgabe von Metallen (Blei, Zink, Kupfer, Cadmium) negativ auf die Gesundheit einiger Wasserorganismen auswirken kann (Monsees et al., 2017; Lindholm-Lehto, 2023). Die Diskrepanz verschiedener pH-Voraussetzungen wird häufig, vor allem jedoch in aquap. Anlagen, durch die Einstellung eines Toleranzwertes (pH 7) der verwendeten Tier- und Pflanzenspezies eines Kreislaufsystems gelöst (Tyson et al., 2004; Savidov et al., 2007; Goddek et al., 2015). Dabei werden eventuelle Leistungsdefizite des Systems wie z. B. eine geringere Nährstoffaufnahme der Kulturpflanzen oder aber eine verminderte Nitrifikationsrate der Bakterien im Biofilter zugunsten einer Systemstabilität in Kauf genommen. Kritisch wird es jedoch, wenn es durch z. B. eine verringerte Pufferkapazität im System (niedrige Alkalinität) oder durch einen zu hohen Tierbesatz zu einem sog. „pH-Sturz“ kommt ($< 5\text{ pH}$). In diesem Fall kann der Mineralisierungsprozess bzw. die Nitrifikation von verschiedenen Stickstoffverbindungen im Biofilter zum Erliegen kommen. Dadurch können sich Zwischenprodukte der Nitrifikation wie Nitrit (NO_2^-) anreichern, welche bereits in geringen Konzentrationen toxisch für viele Fischarten sein können. Zudem verschiebt sich bei einem pH-Sturz das chemische Gleichgewicht zwischen Ammoniak (NH_3) und Ammonium (NH_4^+) zugunsten von NH_4^+ , welches sich als vergleichsweise weniger toxisches Hauptstoffwechselprodukt von Zuchtfischen dann im Prozesswasser verstärkt anreichert (Losordo et al., 2000; Rakocy et al., 2000; Branson, 2008, S. 150–184). In funktionierenden Systemen mit stabilen, neutralen pH-Werten liegen Stickstoffverbindungen vorwiegend als NH_4^+ und NO_3^- vor. Kommt es jedoch zum beschriebenen Ungleichgewicht, muss

zur Stabilisierung des Systems schnellstmöglich ein großvolumiger Wasseraustausch erfolgen oder die Alkalinität gezielt durch die Zugabe von Karbonaten (z. B. Natrium- oder Calciumcarbonat) erhöht werden.

- **Leitfähigkeit und Salzgehalt**

Die elektrische Leitfähigkeit (EC) ist ein Maß für die Gesamtkonzentration gelöster Ionen in einer Lösung und wird in AQ-Betrieben sowie in Aquaponikanlagen als Indikator zur Bestimmung des Salz- bzw. Nährstoffgehaltes und zur Bewertung der Wasserqualität im Kreislaufsystem für den Kulturbesatz genutzt. Als physiko-chemischer Parameter ist sie von der Wassertemperatur und dem Umgebungsdruck abhängig und wird standardmäßig bei einer Referenztemperatur von 25 °C auf einer Skala von 0 bis 50.000 in $\mu\text{S}/\text{cm}$ gemessen (Manns, 2012). Wichtige geladene Bestandteile von Süßwasser können beispielsweise Kalzium (Ca^{2+}), Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Hydrogenkarbonat (HCO_3^-), Chlor (Cl^-) oder Sulfat (SO_4^{2-})-Ionen sein (Timmons et al., 2018). Der Salzgehalt einer Lösung, welcher eng mit ihrer Leitfähigkeit verknüpft ist, wird üblicherweise in PSU oder ‰ angegeben, wobei die Messergebnisse der Leitfähigkeit nicht vollständig mit dem gemessenen Salzgehalt korrelieren. Anhand der Konzentration gelöster Salze lässt sich Wasser in Süßwasser (<0,5 ‰), Brackwasser (0,5–30 ‰) und Salzwasser (>30 ‰) klassifizieren UNESCO (1981). Diese Einteilung ist entscheidend für die Auswahl geeigneter AQ-Spezies und für das Management der Wasserqualität. Im Meerwasser überwiegen üblicherweise höhere Ionen-Konz. an Cl^- und Na^+ -Ionen, während im Süßwasser niedrigere Salz-Konz. verschiedener Karbonate (CO_3^{2-}) und Hydrogenkarbonate (HCO_3^-) vorherrschen (Lindholm-Lehto, 2023). Typische EC-Messungen für Süßwasser liegen daher oft in einem Messbereich von etwa 0 bis 1.500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, wohingegen Messungen im Meerwasser üblicherweise um 50.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ angegeben werden (MRCCC, 2013). Für den Fischbestand einer Anlage ist der Salzgehalt des Kreislaufwassers von besonderer Bedeutung, da Fische die Konzentration gelöster Salze in ihren Körperflüssigkeiten durch Osmoregulation aufrechterhalten, indem sie die Aufnahme von Ionen aus der Umwelt sowie die Begrenzung von Ionenverlusten regulieren (Timmons et al., 2018). Man unterscheidet daher hyperosmotische (im Süßwasser lebende) und hypoosmotische (im Salzwasser lebende) Arten, die jeweils eigene Optimal- und Toleranzbereiche ihres bevorzugten Salzgehaltes besitzen (Freire & Sampaio, 2021). Der verwendete Salzgehalt in einer Fischzucht kann sich somit auch auf die Entwicklung und das Wachstum der Tiere auswirken (Árnason et al., 2013; Timmons et al., 2018; Ytrestøyl et al., 2020). Ähnlich wie bei Fischen spielt auch der Salzgehalt im Kreislaufwasser für Pflanzenkulturen in Aquaponikanlagen eine essenzielle Rolle. Hier informiert der Leitwert über den Nährstoffgehalt des eingesetzten Prozesswassers, welches charakteristisch in seiner mineralisierten Zusammensetzung aus Stoffwechselprodukten des Biofilters und Futtermittelbestandteilen einer Anlage ist (Kapitel: 1.3, Aquaponik). Eine Akkumulation von verschiedenen Salzen in aquap. Anlagen kann durch eine unausgeglichene Nährstoffversorgung oder aber durch Evapotranspiration geschehen, da entweder bestimmte Nährstoffe nur geringfügig abgebaut werden oder aber sich durch einen Wasserverlust über die Zeit in dem Kreislaufwasser höher konzentrieren. In beiden Fällen lässt sich ein kontinuierlich steigender EC-Wert als auch eine Zunahme der Salinität beobachten, der letztendlich sowohl kritisch für das Pflanzenwachstum (Rakocy et al., 2006) als auch für den Nitrifikationsprozess (Yogalakshmi & Joseph, 2010; Gao et al., 2020) werden kann.

- **Sauerstoff**

Seit der Entstehung von Leben in der Entwicklungsgeschichte des Planeten Erde ist das Element Sauerstoff (O) ein fester Bestandteil von Stoffkreisläufen und Stoffwechselprozessen vieler lebender Organismen über und unter Wasser. Als Gas besitzt Sauerstoff (O₂) nur eine geringe Löslichkeit in Flüssigkeiten (Mallya, 2007, S. 11). Diese wird physikalisch durch seinen Partialdruck in der Atmosphäre sowie über die Temperatur und den Salzgehalt einer Flüssigkeit bestimmt (Tromans, 2000). So kommt es, dass unter gleichem O₂-Partialdruck (pO₂) warmes Meerwasser ein geringeres Sättigungspotenzial an gelöstem Sauerstoff besitzt als vergleichbar temperiertes Süßwasser (Mallya, 2007, S. 11). Während das Sättigungspotenzial des Wassers seine absolute Verfügbarkeit festlegt, bestimmt der Partialdruckgradient, wie schnell O₂-Moleküle in das Anlagenwasser einer AQ-Anlage und darüber hinaus in das Blut eines Fisches gelangen können (Mallya, 2007, S. 11-12). Erklärt wird dieser Sachverhalt dadurch, dass sich Sauerstoff hauptsächlich durch Diffusion durch die Kiemen der Fische bewegt. Somit kann nach Crampton et al. (2003) die Geschwindigkeit der O₂-Diffusion durch die Fläche der Kiemen eines Fisches unter Verwendung des ersten Fick'schen Diffusionsgesetzes mittels der Diffusionsdistanz durch die Kiemenepithelien, der Diffusionskonstante und durch den Unterschied des Partialdrucks bestimmt werden. Folglich ist pO₂ der am besten geeignete Parameter für die Angabe des Sauerstoffgehalts (DO) innerhalb von AQ-Anlagen. Jedoch wird die O₂-Konz. (in mg/L) als gebräuchlicher Parameter öfter verwendet, da unter einer bestimmten Temperatur und Salinität der Partialdruck und die Sättigung an gelöstem Sauerstoff in einem linearen Zusammenhang stehen.

Fische nutzen den gelösten Sauerstoff, um eingetragenes Futter in Biomasse umzuwandeln. Die Effizienz dieses Prozesses variiert aufgrund der bevorzugten O₂-Gehalte einer Art (5 mg/L Warmwasserarten und 7 mg/L Kaltwasserarten) und ihres Alters (Pillay, 1990, S. 630; Mallya, 2007, S. 13; Lindholm-Lehto, 2023). Einige Arten (*Rhamdia quelen*, Braun et al., 2006) können, unter gewissen Einschränkungen bezüglich ihres Verhaltens, Futteraufnahmevermögens und Wachstums durch Anpassung an besondere Umweltbedingungen sogar DO-Werte unter 3 mg/L tolerieren (Braun et al., 2006). In AQ-Betrieben gelten niedrige Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff allerdings als eine der Hauptursachen für Stress, Appetitlosigkeit, schlechtes Wachstum, Krankheitsanfälligkeit und hohe Sterblichkeit von Zuchtfischen (Mallya, 2007, S. 14; Boyd & Hanson, 2010; Zhang et al., 2011; Espinal & Matulić, 2019). Viele Fischarten zeigen bei DO-Werten unter 5 mg/L eine verminderte Futteraufnahmefähigkeit (Braun et al., 2006; Mallya, 2007, S. 17). Der DO-Wert beeinflusst somit indirekt auch das Futterumwandlungsverhältnis (FCR) von Zuchtfischen. Eine erfolgreiche Fischproduktion in einer AQ-Anlage ist daher auch von einem guten O₂-Management abhängig. In intensiv bewirtschafteten Aquakulturanlagen wird das Kreislaufwasser mithilfe effizienter Gasaustauschsysteme nahe an einer Sauerstoffübersättigung gehalten, um den O₂-Bedarf der Fische zuverlässig zu decken. Durch diese gezielte Sauerstoffanreicherung lässt sich die natürliche Tragfähigkeitsgrenze eines AQ-Systems erweitern, sodass höhere Besatzdichten und damit eine gesteigerte Gesamtproduktion realisiert werden können (Mallya, 2007, S. 15; Espinal & Matulić, 2019).

- **Redox-Potenzial**

Redoxreaktionen gehören neben anderen chemischen Reaktionen wie Säure-Base-Reaktionen und Ausfällungsreaktionen zu den wichtigsten chemischen Reaktionen in der Natur. Eine Redoxreaktion beschreibt eine chemische Reaktion, bei der es zu einem Austausch (Reduktion und Oxidation) von Elektronen zwischen zwei chemischen Spezies kommt (Bye, 2017).

Redoxbedingungen in einer Lösung werden elektrisch mit dem Redoxpotenzial in (mV) gemessen. Das Potenzial wird gegen den Standardwert einer Referenzelektrode (z. B. Kalomel-Elektrode) in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert gemessen und zeigt die Tendenz einer Lösung an, Elektronen zu oder von einer Referenzelektrode zu übertragen (Bye, 2017). Niedrige Potenziale weisen hierbei auf reduzierende Bedingungen, niedrige Oxidationsstufen chemischer Verbindungen und niedrige effektive Elektronegativität der Lösung hin, wohingegen hohe Potenziale auf oxidierende Bedingungen, hohe Oxidationsstufen chemischer Verbindungen und eine hohe effektive Elektronegativität einer Lösung hindeuten (Bye, 2017). In natürlichen Gewässern ist die Ausbildung von Zonen mit niedrigem Redoxpotenzial nicht unbedingt vorteilhaft, da sie mit der Mobilisierung und erhöhten Toxizität von Metallen sowie der Entstehung hypoxischer Bedingungen in Verbindung gebracht werden (Gambrell, 1994; Stumm & Morgan, 1996, S. 426-464; Bye, 2017; Manahan, 2022, S. 54, 61). Potenzialmessungen in stabilen aquatischen Systemen zeigen oft Messwerte zwischen +300 und +500 mV (Manahan, 2022, S. 54, 61). In den letzten Jahren hat das Interesse gegenüber vorherrschenden Redoxbedingungen in künstlichen, vom Menschen bewirtschafteten Kultursystemen (z. B. Aquakultur oder Aquaponik) aufgrund der O₂-Verfügbarkeit und des Nährstoffgehalts in den Anlagen weiter zugenommen (Estensen, 2021). In intensiven AQ-Systemen können hohe organische Belastungsraten z. B. durch die Anhäufung von Fäzes und Schlamm eine Ursache für die Überschreitung der mikrobiellen Mineralisierungskapazität des eingesetzten Filtersystems darstellen (Robinson et al., 2016). Dabei kann es zu einer Hypoxie (Sauerstoffarmut) in der Wassersäule und zur Freisetzung toxischer Stoffwechselprodukte (z. B. NH₃, NO₂⁻ oder Schwefelwasserstoff (H₂S)) kommen, die sich im Folgenden negativ auf die Gesundheit und das Überleben des Tierbestandes auswirken (Tanudjaja, 2021). Durch den hohen Nährstoffgehalt des Prozesswassers in RAS-Anlagen und aquap. Systemen wird ein ausreichender O₂-Gehalt für das Überleben des Tierbestandes, aber auch für biochemische Prozesse wie die Nitrifikation und die Biodegeneration von organischem Material zur Erhaltung eines oxidierenden Milieus (positiven Redoxpotenzials) empfohlen (Weiner, 2008).

- **Lichtempfindlichkeit und Farbwahrnehmung**

Das Sonnenlicht stellt die wichtigste natürliche Lichtquelle auf unserem Planeten dar und ist für das Leben vieler Organismen (Tiere und Pflanzen) essenziell. Seine lebensbeeinflussenden Eigenschaften sind sehr variabel und wirken mit hoher Geschwindigkeit und über große Entfernungen in Form von Intensität, Qualität (Farbe) und Periodizität (Boeuf & Le Bail, 1999; Lee et al., 2014). Diese Eigenschaften unterliegen natürlichen Umweltbedingungen und verändern sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Breitengrad, der Saisonalität und über die Zeit. Im Gegensatz zu seiner Wirkungsweise in terrestrischen Systemen unterliegt das einfallende Sonnenlicht in aquatischen Ökosystemen starken Veränderungen und wird bereits beim Eindringen in die obersten Schichten des Wasserkörpers (ab 2 m Tiefe) selektiv absorbiert, was zu einer Veränderung seiner spektralen Zusammensetzung führt (Lee et al., 1998; Boeuf & Le Bail, 1999; Bricaud et al., 2010). Des Weiteren kommt es im Wasserkörper selbst zu physikalischen Sekundärreaktionen wie Reflexion, Brechung oder der Streuung des Lichts, was seinen Einfluss auf die aquatische Umwelt prägt (Clarke, 1965; Jerlov, 1968, S. 13-24; Buiteveld et al., 1994). Messeinheiten, die auf der Erdoberfläche Verwendung finden (z. B. Lux, Lumen), versuchen die relative Beleuchtungsstärke von weißem Licht quantitativ zu messen und sind daher für Messungen in aquatischer Umgebung nicht optimal, weil sich das Verhältnis zwischen Lux und sichtbarer einfallender Energie mit der Wellenlänge (d. h. mit zunehmender Wassertiefe) verändert (Murray, 1993). Die Bestrahlungsstärke (W/m²/nm) eignet sich in diesem Zusammenhang besser als

zuverlässige Messeinheit, da sie die Wellenlänge des vorherrschenden Lichtspektrums mit berücksichtigt (Boeuf & Le Bail, 1999).

Wie viele andere aquatische Organismen bewegen sich Fische innerhalb ihrer Umwelt. Je nach Art wird ihr Lebenszyklus dabei oft von den vorherrschenden spezifischen Lichtbedingungen bestimmt. Die Empfindlichkeit gegenüber den Lichtbedingungen unterscheidet sich zudem nach Art und verändert sich auch im Laufe ihrer Ontogenese (Almazán-Rueda et al., 2005). So entwickeln sich die Augenpartien von Fischlarven sehr früh und ermöglichen ein dichromatisches Sehfeld, bei dem die Farbunterscheidung auf zwei unterschiedlichen Zapfentypen des Auges basiert (Downing, 2002; Sierra-Flores et al., 2016). In ihrer artspezifischen Entwicklung erweitert sich dieses Sehfeld unter Hinzufügung weiterer Zapfenphotorezeptoren (Evans & Browman, 2004) und einer Duplexnetzhaut zu einer trichromatischen oder quadrichromatischen Farbwahrnehmung (Lee et al., 2014). Die Ausbildung der Farbwahrnehmung bzw. einer max. Empfindlichkeit geschieht somit artspezifisch und nach Anpassung an den vorliegenden Lebensraum einer ökologischen Nische (Allen, 1971; Boeuf & Le Bail, 1999; Kusmic & Gualtieri, 2000; Temple, 2011). Da sich die Augen junger Fischlarven vor allen anderen Sinnesorganen ausbilden (Sierra-Flores et al., 2016), benötigen die jungen Fische einen Mindestschwellenwert an Lichtintensität für eine erfolgreiche Jagd nach Beute (Boeuf & Le Bail, 1999). Die Lichtintensität beeinflusst zudem den Hormonhaushalt (z. B. Melatonin), die Pigmentbildung und – in Kombination mit dem Einfallswinkel des Lichts – die circadianen Rhythmen sowie das Zeitgefühl von Fischen (Bolliet et al., 1997; Boeuf & Le Bail, 1999; Almazán-Rueda et al., 2005) und entscheidet somit sekundär über ihren Habitus und ihr Verhalten. Die physikalischen und biologischen Daten zur Lichtempfindlichkeit einer Art sind wichtig für ein besseres Verständnis ihrer Entwicklung und davon ausgehenden Präferenzen. Sie bilden einen wichtigen Bestandteil einer artgerechten Haltung und können zudem über den Produktionserfolg einer AQ-Anlage entscheiden.

Unnatürliche Lichtbedingungen können sich negativ auf die Biologie von aquatischen Organismen auswirken, welche sich in Form von Stress, Verhaltensveränderungen, schlechter Futteraufnahme oder hoher Sterblichkeit niederschlagen können (Boeuf & Le Bail, 1999; Sallehuddin et al., 2017). In AQ-Betrieben kann dies insbesondere dann auftreten, wenn Informationen über artspezifische Lichtbedürfnisse fehlen oder handelsübliche Lichtröhren empirisch und ohne Anpassung eingesetzt werden. Allerdings hat sich gezeigt, dass sich die Verwendung von speziellen Beleuchtungsmitteln in Zuchtanlagen mit spezifischer Intensität und Spektralgehalt nachweislich auf die Entwicklung, das Wachstum und das Überleben von Fischen auswirkt (Sierra-Flores et al., 2016). Da die Zuchtbedingungen in AQ-Anlagen auf ein möglichst optimales Wachstum und betriebliche Effizienz ausgerichtet sind, ist auch die Futteraufnahme der Fische möglichst effizient strukturiert. In modernen AQ-Anlagen aufgezogene Fische müssen nicht mehr aktiv jagen, sondern werden automatisch mit speziellen Granulatfuttermitteln gefüttert. Die Farbe des eingesetzten Futters im Kontrast zur farblichen Umgebung des Zuchtbeckens kann laut Studienergebnissen darüber hinaus einen Beitrag zur Effizienzsteigerung der Futteraufnahme eines Tierbestandes leisten (Fatollahi & Kasumyan, 2006; Ullmann et al., 2011). Daher werden in Mast- und Aufzuchtanlagen Beleuchtungsbedingungen empfohlen, die der Farbwahrnehmung der Tiere entsprechen, eine optimale Nutzung des artspezifischen Sehfeldes ermöglichen und letztlich das Wachstum des Fischbestands fördern (Aksnes & Giske, 1993; Downing, 2002; Mukai & Lim, 2014; Lee et al., 2017).

- **Akustik**

Akustische Signale spielen seit der frühen Entwicklung von Leben eine wichtige Rolle in der Evolutionsgeschichte auf dem Planeten. Eine Grundvoraussetzung für die Entstehung einer Schallwelle ist laut Speaks (2024, S. 7) die Schwingungsfähigkeit eines Körpers und die damit verbundenen physikalischen Eigenschaften von Masse und Elastizität. Sie entsteht dann, wenn es zu einem mechanischen Anstoß von Molekülen kommt, der von einem Druckabfall begleitet wird, wodurch sich anschließend eine Längswelle in einem Medium auszubreiten beginnt (Bart et al., 2001; Bass & Clark, 2003; Nummela & Thewissen, 2019). Physikalisch können Schallwellen anhand ihrer Frequenz, Wellenlänge und Amplitude charakterisiert werden, wobei der Frequenzbereich und die Wellenlänge einer Schallwelle zusammen mit der Impedanz (Schallwiderstand) eines Mediums ihre Ausbreitungsgeschwindigkeit bestimmen (Beranek, 1988; Bass & Clark, 2003). So besitzt Wasser als Medium eine 5-mal höhere Impedanz als Luft, was verhindert, dass sich Schallwellen bis auf Weiteres verlustfrei aus der Luft in das Wasser übertragen können (Bradbury & Vehrencamp, 1998; Peng & Zhang, 2016). Des Weiteren ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer Schallwelle im Wasser bis zu 5-mal höher (1.530 m/s) als vergleichbar in der Atmosphäre (340 m/s) (Nummela & Thewissen, 2019). Zusätzlich finden unter Wasser weitere physikalische Sekundärreaktionen (z. B. Brechungen, Refraktion, Reflexionen, Übertragungsverluste, Dämpfungen oder Beugungen) von Schallwellen zwischen Objekten und Oberflächen statt (Bass & Clark, 2003), welche sich auf die akustische Übertragung auswirken. In der Regel wird die Messung des Schalldruckpegels von vielen Bioakustikern der Schallintensität vorgezogen. Diese wird nach gängiger Konvention auf einer logarithmischen Skala in Dezibel (dB) abgebildet, wobei der gemessene Schalldruck (μPa) in Bezug zum allgemein vereinbarten Referenzdruck (ref.) ($20 \mu\text{Pa}$ in Luft und $1 \mu\text{Pa}$ in Wasser) abgebildet wird (Bass & Clark, 2003; Nummela & Thewissen, 2019).

In der Tierwelt werden akustische Geräusche für eine Vielzahl von Tätigkeiten – z. B. zum Aufspüren von Beute, Revierbildung, Balz oder allgemein zur Kommunikation – verwendet. Schallwellen werden von Tieren über ihre Sinnesorgane (z. B. Ohren) eingefangen und das empfangene Signal über mechanorezeptorische Strukturen an das Nervensystem übertragen. Dabei entscheiden die Art, die Struktur und die Größe eines Ohres über seine Hörempfindlichkeit. Unter den Wirbeltieren besitzen nur die Säugetiere ein echtes Hochfrequenzgehör, mit welchem Schallwellen mit bis zu 100 Kilohertz (kHz) registriert werden können (Nummela & Thewissen, 2019). Anders als bei Säugetieren können Fische Partikelbewegungen und sich ausbreitende Schallwellen im Wasser nicht nur über ihr Innenohr, sondern auch über ihr Seitenlinienorgan (Popper & Fay, 1999; Popper & Lu, 2000) und sogar mit ihrer Schwimmblase wahrnehmen (Popper & Lu, 2000; Schulz-Mirbach et al., 2019). In den meisten Knochenfischarten (Teleostei) geschieht die Reizübertragung feinsten hydrodynamischer Signale über sog. Haarzellen im Innenohr (otolithische-Struktur) und in den halbrunden Kanälen des Seitenlinienorgans (Popper & Lu, 2000; Bart et al., 2001), wobei sich ihre Empfindlichkeit deutlich voneinander unterscheidet (Bleckmann, 1986; Popper & Lu, 2000). Fischarten, die hauptsächlich Geräusche über eine direkte Stimulation ihrer Otolithstruktur wahrnehmen (Hörgeneralist), neigen im Vergleich zu Fischarten mit einer akustischen Koppelung ihrer Schwimmblase zum Innenohr (Hörspezialist) zu einer schlechteren auditiven Sensitivität (Popper et al., 1982; Schulz-Mirbach et al., 2019). Hörgeneralisten können daher laut Studien keine Töne über 1,5 kHz wahrnehmen, wohingegen Hörspezialisten Signale direkt als auch indirekt mit Frequenzen bis weit über 39 kHz registrieren können (Popper & Lu, 2000). In AQ-Anlagen können die Auswirkungen von künstlichem Unterwasserlärm direkt nachvollzogen werden (Fay, 2009; Popper & Hastings, 2009), da er dort die Wachstumsleistung (Dytham & Simpson, 2007; Kusku et al., 2019), physiologische Reaktionen (Mills et al., 2020; Sierra-Flores et al., 2015; Nedelec et al., 2016) und das

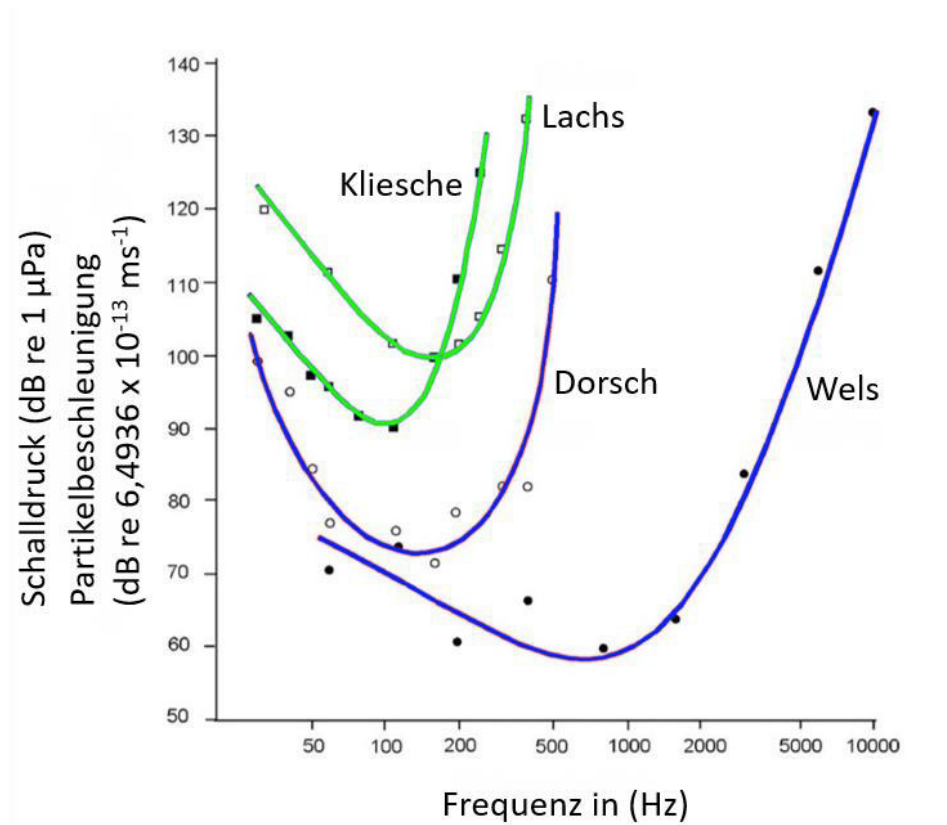


Abbildung 4: Akustisches Wahrnehmungsvermögen verschiedener Fischarten modifiziert nach Popper et al. (2022).

Verhalten von Kulturorganismen (Shafiei Sabet et al., 2016; Simpson et al., 2016; Wang et al., 2019) beeinflussen kann. Durch den permanenten Einsatz von technischen Geräten des Anlagenmanagements (Pumpen, Wartungsmaschinen und Reinigungsgeräte) kann eine direkte Emission des Anlagenlärms in den Wasserkörper oft gar nicht oder nur im geringen Maß verhindert werden (Bart et al., 2001; Hang et al., 2021). Typische Frequenzen in Haltungsbereichen von AQ-Anlagen liegen laut Studienergebnissen hauptsächlich unterhalb von 2.000 Hz mit einem gemessenen Schalldruckpegel zwischen 100 und 150 dB (ref. 1 µPa, zum Meeresspiegel RMS) (Hang et al., 2021), was dem Hörbereich vieler Knochenfischarten entspricht (Abbildung 4) (Bart et al., 2001; Piedrahita, 2003; Crab et al., 2007; Craven et al., 2009; Martins et al., 2010; Sigray & Andersson, 2011). Tatsächlich können Fischarten unterschiedlich auf die Lärmbelastung in Haltungsbereichen reagieren. Je nach Tierart und Art des Emissionseintrags können hierdurch Veränderungen von Schwimmaktivität, Flucht-, Schutz- oder Fortpflanzungsverhalten neben einem veränderten Fressverhalten und einem erhöhten stressinduzierten Cortisolspiegel in den Zuchtbeständen auftreten (Martins et al., 2010; Neo et al., 2016; Simpson et al., 2016; De Jong et al., 2020; **Baßmann et al., 2023**). Höhere Emissionswerte an Unterwasserlärm können somit die Gesundheit von Zuchtfischen beeinträchtigen und dadurch die Produktionsleistung sowie die wirtschaftliche Effizienz von Aquakulturbetrieben negativ beeinflussen (Ashley, 2007; Turnbull & Huntingford, 2012), weshalb eine Vermeidung von zu hohen Schallimmissionen in Haltungsbereichen für besonders empfindliche Fischarten angestrebt werden sollte (**Baßmann et al., 2023**).

1.5.2 Chemische Haltungsbedingungen

In RAS-Anlagen mit einer Kopplung zu aquap. Pflanzenkulturen werden für ein optimales Pflanzenwachstum 16 verschiedene Elemente in unterschiedlichen Konzentrationen und Mengenverhältnissen benötigt (Rakocy, 2012, S. 366). Die Elemente lassen sich laut Rakocy (2012) in Makroelemente, welche in großen Mengen benötigt werden und Mikroelemente, die in geringeren Konzentrationen benötigt werden einteilen. Für die in den RAS-Anlagen lebenden AQ-Organismen kommen den Konz.-Verhältnissen der einzelnen Elemente im Prozesswasser ebenso viel Bedeutung zu, da diese ihre Gesundheit, metabolische Prozesse und ihr Wachstum direkt beeinflussen können (Meriç, 2017; Strauch et al., 2018).

- **Makroelemente aus RAS-Anlagen für eine aquaponische Nutzung**

In RAS-Anlagen, in denen Chargen unter hoher Besatzdichte produziert werden, ist sowohl das Konzentrationsniveau als auch das Mischungsverhältnis chemischer Elemente und Moleküle von zentraler Bedeutung für die Wasserqualität und das Wohlergehen der Kulturorganismen. Nicht nur ihre elementare Zusammensetzung, Ladung und Oxidationszahl, sondern auch ihre damit verbundenen toxischen oder suppressiven Eigenschaften können negative Auswirkungen auf die Gesundheit des Tierbestandes haben (Naddy et al., 2002; Yildiz et al., 2006; MacIntyre et al., 2008; Hossain & Yoshimatsu, 2014; Roques et al., 2015). Gleichwohl ist die Zusammensetzung des nährstoffreichen Anlagenwassers essenziell für eine erfolgreiche Pflanzenzucht in RAS-Anlagen mit einer Kopplung zu aquap. Systemen. Üblicherweise werden in der Chemie die Konzentrationen chemischer Verbindungen in einer idealen Lösung mit ihrer Stoffmengenkonz. (Molarität) in mol/L oder mmol/L angegeben. In der gängigen Praxis hat sich dies aber als unpraktisch bzw. relativ ungenau herausgestellt, da die Messung der Konzentration temperaturabhängig ist und eine Angabe in mol/L fehlerbehaftet wäre. Infolgedessen wird auf massenabhängige Einheiten (mg/L, µg/L) zurückgegriffen, welche auch in ppm oder in ppb dargestellt werden können. Zu den wichtigsten Vertretern pflanzenrelevanter Makroelemente im Prozesswasser intensiver RAS-Anlagen zählen laut wissenschaftlicher Studien Stickstoff (N), Kalium (K), Kalzium (Ca), Magnesium (Mg), Phosphor (P) und Schwefel (S) (Rakocy, 2012; Bittsánszky et al., 2016; Delaide et al., 2017a; Strauch et al., 2018). Diese werden vor allem durch Überreste des Fischfutters (Kapitel: 1.4.3, Fütterungsmanagement in der Aquakultur), Stoffwechselprodukte von Fischen aber auch über die Zuführung von Frischwasser aus Brunnen oder Flüssen in das System eingetragen (Rakocy, 2012; Strauch et al., 2018).

Unter den Stickstoffverbindungen, die – neben K, P, Mg, Ca und S – einen wesentlichen Bestandteil des Nährstoffbedarfs von Pflanzen in aquap. Systemen darstellen (Kapitel 1.3, Aquaponik; Schneider et al., 2005; Bittsánszky et al., 2016), kommt dem fakultativen Gehalt von NH_3 und NO_2^- im Wasser einer Aquaponikanlage eine besondere Bedeutung für den Fischbestand zu. Aufgrund ihrer toxischen Eigenschaften für die aquatische Fauna (NH_3 -Gewebschädigung (Rama & Manjabhat, 2014); NO_2^- -Suppression des O_2 -Transports (Lefevre et al., 2014)) können beide Verbindungen je nach Fischart bereits in geringen Konzentrationen (NH_3 , 0,02 mg/L (Klein, 2016); NO_2^- , 0,24 mg/L (Kroupova et al., 2005)) tödlich sein. Ihre toxischen Eigenschaften werden zum Teil zusätzlich extrinsisch über physiko-chemische Umweltparameter beeinflusst oder über ihre jeweilige Konzentration verstärkt. Somit kann z. B. ein zu niedriger DO die NO_2^- Toxizität verstärken (Ferreira Da Costa et al., 2004), wohingegen ein zu hoher pH-Wert die Entstehung von NH_3 forcieren kann (Thurston et al., 1981). In gut funktionierenden Kreislaufanlagen werden die hierfür entscheidenden Umweltparameter durch ein gezieltes Anlagenmanagement stabilisiert, sodass die $\text{NH}_3/\text{NO}_2^-$ -Konz. durch mikrobielle Umwandlung (Nitrifikation)

möglichst konstant in pflanzenverfügbares Nitrat (NO_3^-) überführt werden (Kapitel: 1.2, Geschichte der Aquakultur und die Entstehung von modernen Kreislaufanlagen (RAS)). In RAS-Anlagen ohne eine aquap. Kopplung kann sich NO_3^- , zusammen mit allen anderen Makroelementen (P, K, Ca, Mg, S), im Wasserkörper über die Zeit anreichern (Strauch et al., 2018). Die Grenzwerte für Makroelemente, wie z. B. für Nitrat (NO_3^-), sind in intensiven RAS-Anlagen artspezifisch und liegen laut Literaturangaben für viele Fischarten zwischen 10 und 300 mg/L (Masser et al., 2000; Camargo et al., 2005; Rakocy et al., 2016; Torno et al., 2018). Neben den sich im Wasser anreichernden Makroelementen können sich einige von ihnen zudem auch als Ausfällungsprodukte chemischer Reaktionen im Anlagenschlamm akkumulieren (Ca, P) und nur über Reinigungsarbeiten oder einen großzügigen Wasserwechsel ausgetragen werden (Strauch et al., 2018; Prüter et al., 2020; Schleyken et al., 2024). Generell kann der Bedarf bestimmter im AQ-Prozesswasser vorkommender Makroelemente (Ca, Mg, S) bereits durch die Wasserentnahme aus Flüssen oder Brunnen abgedeckt werden (Delaide et al., 2017a; Strauch et al., 2018). Eine Analyse des Prozesswassers in einigen Studien wies allerdings darauf hin, dass die Nährstoffverteilung oft sehr heterogen vorliegt und einige der Hauptnährstoffe (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-}) auch durch einen übermäßigen Wasseraustausch ausgetragen werden können (Strauch et al., 2018; Wenzel et al., 2021). Ein gut balanciertes Nährstoffverhältnis ist laut Rakocy (2012) jedoch von Bedeutung, da eine erhöhte Konz. eines Elementes (z. B. K) für eine verstärkte Aufnahme oder Verfügbarkeit eines anderen (z. B. Ca, Mg) sorgen kann (Rakocy, 2012). Beides führt unter längerer Einwirkung zwangsläufig zu Mangelerscheinungen und Qualitätsverlust in Pflanzenkulturen (Nozzi et al., 2018; Yep & Zheng, 2019; Wenzel et al., 2021; Taha et al., 2022). Eine gezielte Nährstoffkontrolle (ggf. gezielte Aufdüngung je nach Anforderung) sollte neben einer regelmäßigen Analyse der Prozesswasserqualität – vom Teststreifen bis Laborbericht – im Anlagenmanagement mit einzuplanen sein, um die Haltungsbedingungen und den Produktionserfolg von Fischen und Pflanzen bestmöglich umzusetzen.

- **Mikroelemente in RAS-Anlagen und in der Aquaponik**

Neben den bereits genannten Makroelementen sind der parallele Eintrag und die Verfügbarkeit von Spurenelementen in RAS-Anlagen – mit oder ohne Anbindung an eine Pflanzenkultur – essenziell, da diese sowohl für die Gesundheit und Widerstandsfähigkeit von AQ-Organismen als auch für ein gesundes Pflanzenwachstum und die Fruchtbildung von Kulturpflanzen nicht zu vernachlässigen sind. Bedeutende Mikroelemente, wie z. B. Eisen (Fe), Mangan (Mn), Bor (B), Zink (Zn), Kupfer (Cu) und Molybdän (Mo) (Rakocy, 2012; Somerville et al., 2014; Bittsánszky et al., 2016; Kasozi et al., 2019), werden dabei – wie auch einige der Makroelemente – bereits über die Grundmischung des Fischfutters (Kapitel: 1.4.3, Fütterungsmanagement in der Aquakultur) und über das Wasser aus Flüssen oder Brunnen eingetragen (Delaide et al., 2017a; Strauch et al., 2018). Je nach Milieu ist ihre chemische Verfügbarkeit in den Systemen aber stark von physiko-chemischen Parametern wie z. B. dem pH-, Redox- oder DO-Wert abhängig (Martins et al., 2011; Rakocy, 2012), was ihre Anreicherung im Anlagenwasser (Co, Mn, Zn, Mo) als auch im Anlagenschlamm (Fe, Cu, Zn, Co, Mo) maßgeblich bestimmt (Van Busse et al., 2014; Strauch et al., 2018; Schleyken et al., 2024). Unter wechselnden Milieubedingungen können sich sogar abgetrennte Fraktionen (Cu, Fe, Zn) wieder mobilisieren und dabei unerwünschte Konzentrationsspitzen bilden (Monsees et al., 2017; Goddek et al., 2018; Lindholm-Lehto et al., 2022), weshalb sowohl ein routinemäßiger Wasseraustausch als auch die Reinigung von Senken in einer AQ-Anlage zwingend erforderlich ist (Goddek et al., 2018).

Für viele aquatische Kulturorganismen sind einige der Spurenelemente (Fe, Cu, Mn und Zn) – ebenso wie die Makroelemente – sowohl an zentralen Stoffwechselprozessen als auch an

immunologischen Funktionen beteiligt (Oliva-Teles, 2012; Lall & Kaushik, 2021), indem sie enzymatische Reaktionen regulieren, mit anderen Elementen und Metalloproteinen um Bindungsstellen konkurrieren, die Permeabilität von Zellmembranen beeinflussen oder die Homöostase im Organismus aufrechterhalten (Versieck & Cornelis, 1989; Lopes et al., 2001; Carriquiriborde et al., 2004; Meriç, 2017). Jedoch können sie auch negative Auswirkungen und Krankheiten begünstigen (Dalzell & Macfarlane, 1999; McGeer et al., 2000; Huang et al., 2015; Shuhaimi-Othman et al., 2015; Prabhu et al., 2016) sobald ihr Konz.-Niveau über dem metabolischen Bedarf steigt (Fawole et al., 2007). Es ist somit zwingend erforderlich, die Grenzwerte der einzelnen Spurenelemente für die verwendeten AQ-Spezies zu kennen, ihre Konz.-Werte in der RAS-Anlagenroutine zu überwachen und den Tierbestand vor einer Überdosierung zu schützen (Kapitel: 1.4.1, Moderne Haltungsbedingungen in der Fischzucht).

Für aquap. Anlagen wird in der Praxis die optimale Nährstoffzusammensetzung von Makro- und Mikroelementen für eine Pflanzenart durch einen Vergleich zu hydroponischen Kulturen bestimmt, deren Nährstoffangebot hauptsächlich durch die Verwendung von Flüssigdüngern erreicht wird (Bittsánszky et al., 2016). Um den Nährstoffanforderungen der Kulturpflanzen einer Aquaponikanlage gerecht zu werden, wird eine Anpassung des Nährstoffeintrags an Makro- und Mikronährstoffen entweder durch eine Intensivierung in der Fischzucht (Kasozi et al., 2019) oder mit Hilfe von Düngern erreicht (Roosta & Hamidpour, 2011; Roosta, 2014; Bethe et al., 2017; Kasozi et al., 2019). Eine Analyse des Nährstoffgehalts zur Wiederverwendung des Kreislaufwassers einer RAS-Anlage ergab jedoch, dass das Nährstoffangebot im Prozesswasser – im Vergleich zu einer optimierten hydroponischen Zuchtlösung – ein unausgewogenes oder unzureichendes Verhältnis bestimmter Nährstoffe (K^+ , Fe^{2+} , Mo^{4+} und Mn^{4+}) für die Pflanzenkultivierung aufwies (Cerozi & Fitzsimmons, 2017; Delaide et al., 2017a; Strauch et al., 2018, Anhang 10.2.1; Wenzel et al., 2021). Gerade für Pflanzen kann dies jedoch zu unterschiedlichen Mangelerscheinungen und einer Qualitätsminderung führen (Anhang 10.2.2), da viele Spurenelemente gerade für das Wachstum oder für die Fruchtbildung benötigt werden (Somerville et al., 2014). Eine Zudüngung von Mikronährstoffen wird daher von vielen Autoren wissenschaftlicher Artikel durch Besprühung (Roosta & Mohsenian, 2012) oder Hinzufügen einer Lösung (Tyson et al., 2008; Anderson, 2016; Kasozi et al., 2019; Curry et al., 2020; Fernández-Cabanás. et al., 2020; Maucieri et al., 2020) nahegelegt bzw. empfohlen.

- **Komplexe Verbindungen in aquaponischen Systemen**

Um die Stabilität und Verfügbarkeit von pflanzenrelevanten Spurenelementen aus dem Prozesswasser von RAS-Anlagen zu verbessern, begann man bereits früh mit der Suche nach geeigneten Lösungsansätzen, um den potenziellen Nährstoffmangel an Spurenelementen von Pflanzen in Aquaponiksystemen zu verringern. Mit Blick auf Düngetechniken, aus der angrenzenden Kultivierungstechnologie der Hydroponik, entwickelte sich auch in der Aquaponik ein Anwendungsbereich für verschiedene Spurenelementdünger (Sallenave, 2016; Bartelme et al., 2018). Laut Kasozi et al. (2019) lassen sich diese in drei Hauptkategorien unterteilen: (1) Anorganische Düngekomponenten (z. B. Salze wie Eisensulfat, $FeSO_4$), (2) synthetische Düngekomponenten (z. B. Chelatverbindungen wie Ethylendiamintetraessigsäure-Komplexe, EDTA) und (3) organische Komplexverbindungen (z. B. Humin- und Zitronensäureverbindungen) welche jeweils Vor- und Nachteile hinsichtlich ihrer Anwendung mit sich bringen (Abbildung 5). Synthetische Düngemittel bestehen allgemein aus chemischen Komplexverbindungen (wie Chelatkomplexen), welche aus einem oder mehreren Liganden sowie einem Zentralteilchen aufgebaut sind und Letzteres durch ihren stabilen Aufbau vor Oxidation und Ausfällung in einer Lösung schützen (Voogt & Sonneveld, 2017; Kasozi et al., 2019; Janiak et al., 2023). Die Stabilität

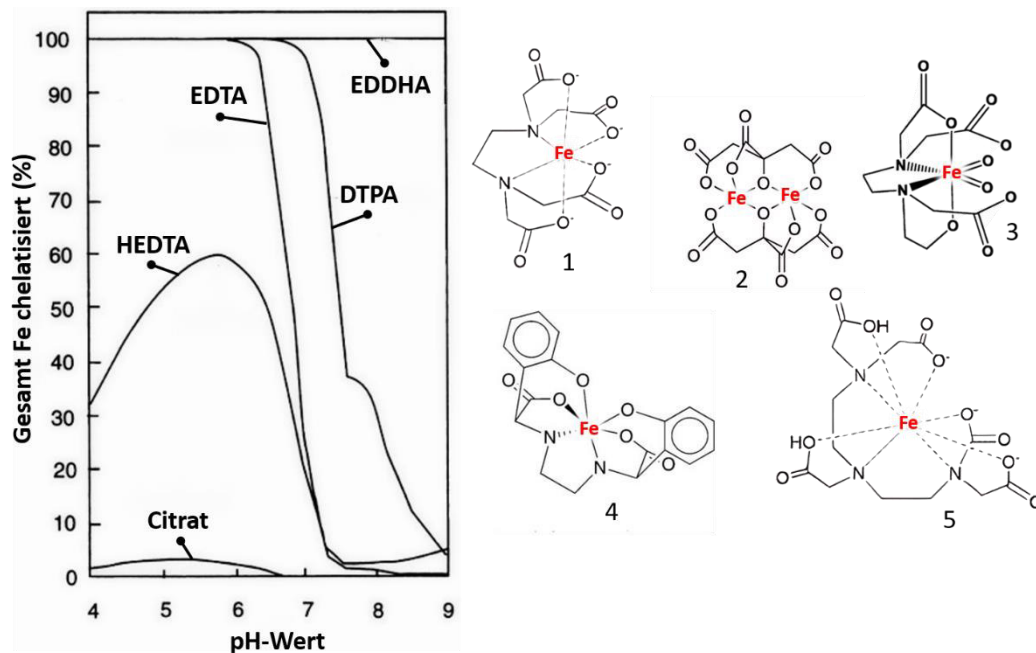


Abbildung 5: Prozentualer Anteil an chelatisiertem Eisen unter verschiedenen pH-Werten für unterschiedliche komplexbildende chemische Verbindungen. Modifiziert nach Anderson et al. (2017). 1: Fe-EDTA (Zhou et al., 2010), 2: Fe-Citrat (Hider et al., 2024), 3: Fe-HEDTA (Wu et al., 2016), 4: Fe-EDDHA (Yunta et al., 2003), 5: Fe-DTPA (Zhou et al., 2010).

verschiedener Komplexverbindungen wird in erster Linie durch die Temperatur und den pH-Wert des Mediums sowie durch die Exposition gegenüber UV-Licht und den Abbaugradienten des Mikrobioms bestimmt (Vadas et al., 2007; Kasozi et al., 2019). Hier unterscheiden sich viele der synthetischen Komplexverbindungen, die aufgrund ihrer unterschiedlichen pH/UV-Stabilität in verschiedenen Einsatzbereichen genutzt werden (z. B. EDTA: pH 4,0–6,0; Diethylentriaminpentaessigsäure-Komplexe, DTPA: pH 4,0–7,0; Ethylendiamin-N,N'-bis(2-Hydroxyphenyl)essigsäure), EDDHA: pH 4,0–9,0; Albano & Miller, 2001 von Kasozi et al., 2019). Von den vielen verfügbaren synthetischen Chelatkomplexen sind EDTA- und DTPA-Komplexe besonders in aquap. Anlagen gefragt, da sie die benötigten Elemente der Übergangsmetalle (Elementgruppen 3–12 des PSE; Kapitel: 1.5.2, Chemische Haltungsbedingungen) sowohl binden als auch mobilisieren können (Di Palma & Mecozzi, 2007; Shahid et al., 2014). Darüber hinaus verfügen sie über eine moderate Komplexstabilität in den, von Aquaponikanlagen bevorzugten pH-Bereichen (Kasozi et al., 2019). Daher zerfallen EDTA- und DTPA-Verbindungen nach einer gewissen Zeit (Tage bis Wochen) und müssen dem Systemwasser neu hinzugefügt werden, um die Supplementierung von Spurenelementen weiter gewährleisten zu können (Sallenave, 2016). In RAS-Anlagen mit aquap. Kopplung kommen bereits gezielt Düngemittel mit Komplexverbindungen zum Einsatz (Roosta & Mohsenian, 2012; Kasozi et al., 2019). Die Nährstoffaufnahme erfolgt dabei über die Blätter bzw. über die Wurzelspitzen (Xylem bzw. Rhizodermis) der Pflanzen. Die Effizienz dieser Aufnahme wird dabei überwiegend durch die Verfügbarkeit von Licht, Sauerstoff und Kohlenhydraten sowie über den Diffusionsgradienten einzelner Ionen zwischen der Nährlösung und der Oberfläche der Wurzelhaare bestimmt (Wang et al., 2006; Pattillo, 2017). Neben diesen Faktoren hängt die Verfügbarkeit einzelner Ionen (z. B. Fe^{2+} , Fe^{3+} ; Mn^{+2} , Mn^{+4}) auch von ihrer Oxidationsstufe ab (Yep & Zheng, 2019), weshalb die Verwendung von Komplexverbindungen gerade in aeroben Systemen von Vorteil erscheint, da diese die entsprechenden Nährstoffe bioverfügbar halten. Obwohl die Anwendung von anorganischen und

organischen Düngemitteln für die, in gekoppelten Aquaponikanlagen lebenden, aquatischen Organismen (Fische, Krebstiere etc.) bereits besser verstanden wurde, ist die Verwendung von einzelnen synthetischen komplexierten Düngemitteln noch nicht hinreichend untersucht worden. Häufig wurden hierzu artspezifische Toxizitätsstudien durchgeführt und Messwerte zur Bestimmung einer Wirkstoffletalität bis 50 % (LD50) in der Literatur angegeben (Sillanpää & Oikari, 1996; Van Dam et al., 1996; Warnick & Bell, 1969). Derartige Studien greifen für das empfindliche Gleichgewicht zwischen dem dynamischen Nährstoffangebot und der Gesundheit der eingesetzten Tierarten in Aquaponikanlagen jedoch oft zu kurz. Ein vertieftes Verständnis der Wechselwirkungen bestimmter Düngemittel lässt sich daher vor allem durch Untersuchungen gewinnen, die sowohl den Produktionserfolg in Form von Biomasse (Pflanze/Tier) als auch die gesundheitlichen Auswirkungen auf den Tierbestand berücksichtigen (Stathopoulou et al., 2021; Hildebrand et al., 2023, 2024b) und infolgedessen in der Lage sind, das Potenzial von Spurenelementdüngern hervorzuheben.

1.6 Der Afrikanische Raubwels *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) in der Aquakultur

- Verbreitungsgebiet und Biologie



Abbildung 6: Foto eines Afr. Raubwelses (*Clarias gariepinus*) in einer RAS-Aquakulturanlage.

Der Afrikanische (Afr.) Raubwels *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) gehört zur Gattung der Raubwelse (*Clarias*) aus der Familie der Kiemensackwelse (Clariidae) und ist eine in zentralafrikanischen Ländern (z. B. Niger und Guinea) beheimatete Welsart (Abbildung 6, Anhang 10.1.3 & 10.1.4). In ihrer natürlichen Umgebung erreicht diese Art Abmessungen von durchschnittlich 90 cm Länge und kann in Extremfällen ein Alter von 15 Jahren (Weyl & Booth, 2008), eine Länge von 1,7 m und ein Gewicht von knapp 60 kg erreichen (Robins, 1991; Froese & Pauly, 2024). Wie viele andere Welsarten besitzt *C. gariepinus* neben mehreren Bartelpaaren, welche rund um das Maul verteilt liegen, ein relativ kleines Augenpaar und einen bezahnten Unterkiefer, der das Fangen von lebender Beute erleichtert (Van Oijen, 1995; Adriaens & Verraes, 1998; Froese & Pauly, 2024). Als omnivore Spezies ernährt sich *C. gariepinus* nicht nur von Insekten, Krebstieren und Fischen (Bailey, 1994; Dadebo et al., 2014; Froese & Pauli, 2024), sondern kann auch pflanzliche Proteine gut verwerten (De Moor, 1988; Fagbenro & Davies, 2001; Agbebi et



Abbildung 7: Einblick in das Suprabranchialorgan von *Clarias gariepinus*. Rechtsseitiger Ausschnitt durch Stirnplatte. Sichtbare kapillare Strukturen (rot) zur Aufnahme von Sauerstoff aus der Atmosphäre durch Ventilation.

al., 2013; Momoh & Solomon, 2017). Für den Beutefang kann die Art neben ihren Barteln auch ihre dichromatische Farbwahrnehmung (Lee et al., 2014) oder elektrische Felder verwenden, um sich zu orientieren und Beute ausfindig zu machen (Hanika & Kramer, 1999, 2000; Baron et al., 2005; Froese & Pauly, 2024). Obwohl die Art einen Großteil ihrer Beute in den Tagesstunden fängt (Rueda, 2004), gilt sie dennoch als lichtscheu (Almazán-Rueda et al., 2005; Manuel et al., 2016). Ein kannibalistisches Verhalten konnte für diese Art ebenfalls beobachtet werden, welches besonders in den ersten Wochen nach dem Larvenschlupf auftritt (Hecht & Appelbaum, 1988; Onwuteaka & Prince, 2015). Um nicht von den eigenen Artgenossen gefressen zu werden bzw. um weitere Fressfeinde abzuwehren, besitzen viele Fischarten – so auch *C. gariepinus* – einen gut ausgeprägten Brustflossenstachel, welcher sich mit fortlaufendem Alter weiter verzahnt und das Herunterschlucken durch Räuber erschwert (Teugels, 1986; Froese & Pauly, 2024). Viele Kiemensackwelse besitzen neben ihren Kiemen ein akzessorisches Atemorgan (Suprabranchialorgan, Abbildung 7), welches ihnen erlaubt bei niedrigen DO-Werten im Wasser atmosphärischen Sauerstoff an der Oberfläche zu atmen (Froese & Pauly, 2024) oder sogar bei Nacht aus dem aquatischen Milieu zu migrieren (Burgess, 1989; Skelton & Norris, 1996; Froese & Pauly, 2024). Gerade zur afrikanischen Trockenzeit kommt dieser Vorteil evolutionärer Anpassung zum Tragen, da sich dann sein natürlicher Lebensraum in Lagunen und Tümpeln verschlammt oder austrocknet und die Raubwelse zwingt, auf engem Raum zusammenzukommen (De Moor, 1988; Păpuc et al., 2019; Froese & Pauly, 2024). Unter diesen Bedingungen nutzen die Welse den schlammig-lehmigen Boden, um kleine Höhlen hinein zu graben, oder suchen Unterstände von Bäumen auf, um sich vor dem Sonnenlicht und eigener Austrocknung zu schützen (Lee et al., 2014). Durch Anpassungen an dieses saisonale Phänomen kann *C. gariepinus* unter gewissen Bedingungen selbst hohe Besatzdichten dulden. Diese Annahme wird sowohl von Feldbeobachtungen (Bruton, 1979c; Păpuc et al., 2019) als auch von experimentellen Untersuchungen in Zuchtbecken von AQ-Anlagen gestützt (Van De Nieuwegiessen et al., 2008; Baßmann et al., 2023). Die Fortpflanzung findet in der Regenzeit statt, in der die geschlechtsreifen Raubwelse (ab etwa 45 cm Länge) zunächst entlang der Flüsse in die

Überschwemmungsgebiete zur Eiablage migrieren (Bailey, 1994) und anschließend von dort in Seen und Flüsse zurückkehren. Nach Bruton (1979a) korreliert die Fruchtbarkeit eines Raubwelsweibchens mit ihrer Länge. Demnach kann ein 90 cm langes Weibchen bis zu 163.000 Eier ablaichen (Anhang 10.1.5), was einer vergleichbar hohen Fruchtbarkeit zu anderen Artverwandten entspricht (Bobe & Labbé, 2015). Nach einer rel. kurzen Inkubationszeit von 24-25 Std. (19–33 °C) schlüpfen die jungen Larven aus dem befruchteten Laich und beginnen nach wenigen Tagen mit der Nahrungsaufnahme in den Überschwemmungsgebieten (Bruton, 1979c; Graaf & Janssen, S. 25).

- **Bedeutung für die Aquakultur**

In seinem ursprünglichen Verbreitungsgebiet (Nigeria, Kongo-Becken, Uganda, Tansania, Botswana, etc.) wird der Afr. Raubwels bereits seit langer Zeit gezüchtet. Seine Resilienz gegenüber unterschiedlichen Umwelteinflüssen sowie seine Anpassungsfähigkeit an verschiedene Haltungsbedingungen führten rund um die Jahrtausendwende – gemeinsam mit der Etablierung geeigneter Fütterungsprotokolle – zu einer rasanten Steigerung der weltweiten Produktion dieser Art, auch in Ländern außerhalb des ursprünglichen Verbreitungsgebietes (Dauda et al., 2018; FAO 2022, S. 43). So wurden laut Zahlen der Vereinten Nationen mehr als 1,2 Mio. t an Afr. Raubwels weltweit im Jahr 2020 produziert (FAO, 2022, S. 43). Obwohl dies ein Wachstum von 0,32 % zum Jahr 2018 darstellt, machen die aktuellen totalen Produktionszahlen dieser Fischart vergleichsweise nur einen verschwindend geringen Anteil der weltweit am häufigsten kultivierten Süßwasserfischarten aus (2,5 % im Jahr 2020; FAO, 2022, S. 43). In Europa wird die, in Afrika beheimatete Welsart wegen ihres hohen Nährstoffgehalts und schmackhaften Filets geschätzt (Wasenitz et al., 2018) und bereits in den frühen 1980er Jahren in niederländischen RAS-Anlagen gezüchtet (EUMOFA, 2021, S. 19). Die kommerzielle Zucht von Raubwelsen in Europa trägt allerdings nur wenig zur globalen AQ-Produktion von *C. gariepinus* bei. So betrug diese im Jahr 2018 lediglich 9 Tsd. t, wobei der Hauptanteil innerhalb von RAS-Anlagen mit 64 % von Ungarn und den Niederlanden erzeugt wurde (EUMOFA, 2021, S. 21). Mit mehr als 148 Tsd. t war Nigeria bereits im Jahr 2017 der wichtigste Produzent von Afr. Raubwels im globalen Ranking und ist es neben aufstrebenden Nationen wie Uganda und Ghana auch heute noch (DAFF, 2018, S. 2; FAO, 2020; Olagunju et al., 2022). Auch in der BRD entwickelte sich in den letzten 10 Jahren ein AQ-Zweig, der sich mit der kommerziellen Aufzucht von Afr. Raubwelsen beschäftigt und vor allem in Mecklenburg-Vorpommern ansässig ist. Raubwelse, die an diesem Standort produziert werden, erhalten nach einer Anzucht mit Larvenfutter ausschließlich industriell optimiertes Pellet-Futter (Roques et al., 2015) und gelangen nach einem schnellen Wachstum mit etwa 12 g in den ersten Produktionsschritt der Fischmast. Anschließend werden die jungen Fische nach einer Sortierung in etwa 4 m³ Mastbecken bis zu ihrem Schlachtgewicht von 1,5 kg gehalten. Wie bei vielen anderen Fischarten auch, muss die Besatzdichte im Laufe der Entwicklung angepasst werden, um keine negativen Effekte (z. B. Aggressivität, Kannibalismus) zu begünstigen (Hecht & Appelbaum, 1988; Shourbela et al., 2016; Wenzel et al., 2022). Obwohl viele Arten unter geringen Besatzdichten besser an Gewicht zunehmen, stellte sich für den Afr. Raubwels heraus, dass der Produktionserfolg auch bei höheren Besatzdichten (200-360 Fischen/m³) erhalten bleibt und daher die Rentabilität einer Charge zunimmt (Islam et al., 2006; Oké & Goosen, 2019; Pasch & Palm, 2021). Trotz dieses biologischen Vorteils stagnierte jedoch die AQ-Produktion von *C. gariepinus* in deutschen Betrieben in den letzten Jahren aufgrund einer pandemiebedingten Krise. Somit fiel das jährliche Produktionsvolumen von anfangs 1.170 t (2019) auf 807 t (2021) zurück (BMEL, 2019, S. 47, BMEL, 2021, S. 49).

- **Physikalische- und chemische Haltungsbedingungen**

Afr. Raubwelse sind in AQ-Betrieben für ihre hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedenen Umweltbedingungen bekannt und erreichen oftmals – trotz mangelnder Wasserqualität oder stärkerer Schwankungen der Haltungsparameter – ein gutes Wachstum (FCR 0,7-0,8, Schram et al., 2014; Roques et al., 2015). Studienberichten zufolge tolerieren Afr. Raubwelse physikalische Haltungsparameter im Anlagenwasser mit Temperaturen von 17,5 bis 35 °C (Păpuc et al., 2019), pH-Werten von 5,3 bis 8,4 pH (Baßmann et al., 2020), Leitwerten von 500 bis 5.000 µS/cm (Van De Nieuwegiessen et al., 2009; Baßmann et al., 2017) sowie mit Sauerstoffwerten von 3-6 mg/L (Palm et al., 2018; Păpuc et al., 2019), ohne dass es zu erhöhter Mortalität innerhalb eines Zuchtbeckens kommt. Redoxpotenziale werden mit Bezug zu seiner Haltung nur selten gemessen, da sowohl der Anlagenbetrieb als auch die allgemeine Haltung dieser Fischart ein positives bzw. oxidatives Milieu erfordern. Ferner erwies sich der Afr. Raubwels gegenüber zahlreichen kritischen chemischen und physikalischen Haltungsparametern sowie gegenüber erhöhten Konz. essenzieller Makroelemente (N, P, K, Mg, Ca, S), wie sie in Aquaponikanlagen auftreten können, als ausgesprochen resilient. Seine Toleranz gegenüber höheren Ammoniumkonz. (NH_4^+) konnte der Afr. Raubwels in den Experimenten von Strauch et al. (2019) und Knaus et al. (2020) verdeutlichen, in deren Zuchtbecken NH_4^+ -Konz. zwischen 10,39 und 16,69 mg/L gemessen wurden. Andere Studien, die extreme NH_4^+ -Konz. mittels NH_4Cl testeten, belegen sogar tolerierbare Konzentrationsspitzen von bis zu 43,2 mg/L, in denen die NH_4^+ -Konz. in den Geweben der Fische niedrig verblieb (Abbink et al., 2009). Auch die Toleranz dieser Fischart gegenüber der deutlich toxischeren Ammoniakkonz. (NH_3), wurde von einigen Studien besonders hervorgehoben (Ip et al., 2004). So wurde z. B. eine vergleichsweise hohe NH_3 -Toxizitätsobergrenze von 24 µM (0,4 mg/L) und eine Gewebetoleranz von 16 µmol/g (Muskelgewebe) beschrieben (Ip et al., 2005; Schram et al., 2010), welche Afr. Raubwelse durch Anpassungen über mehrere Tage hinweg überstehen können. Zum Vergleich: Bereits Konz. von 0,02 mg/L NH_3 können für viele Fischarten eine schädigende Wirkung auf die Gesundheit ausüben (Masser et al., 2000; MacIntyre et al., 2008). Darüber hinaus werden weitere chemische Wasserparameter in Konz. von NO_2^- mit bis zu 0,6 mg/L (Păpuc et al., 2019), NO_3^- bis weit über 140 mg/L (Schram et al., 2014; Păpuc et al., 2019), $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Konz. zwischen 30 und 60 mg/L im 60:40 Verhältnis (Molokwu & Okpokwasili, 2002) für Jungtiere und weit über 251 mg/L im 80:20-Verhältnis für adulte Tiere (Xu et al., 2022), K^+ -Konz. zwischen 200 und 400 mg/L (Wenzel et al., 2021), Orthophosphat (PO_4^{2-})-Konz. mit bis zu 80 mg/L (Strauch et al., 2019) SO_4 und H_2S -Konz. mit bis zu 0,4 mg/L (Păpuc et al., 2019) toleriert und infolgedessen als Grenzwerte bezüglich der Haltung von *C. gariepinus* empfohlen. Spurenelemente stellen nicht nur für die gesunde Entwicklung von Pflanzen, sondern auch für die eigene Gesundheit und das Wachstum eines Fisches einen wichtigen Bestandteil dar. Jedoch können sie in zu hohen Konz. auch Vergiftungserscheinungen hervorrufen. Studien zur Verträglichkeit essenzieller Spurennährstoffe bei Fischen in Aquakulturanlagen und natürlichen Gewässersystemen zeigen, dass Fische gegenüber bestimmten Übergangs- und Halbmetallen eine teils hohe Toleranz besitzen. So wurden tolerierbare Konzentrationen unter anderem für Eisen bis 11 mg/L (Ohimain, 2014); Mn bis 137 mg/L (Awolola et al., 2020); Zn bis 30,9 mg/L (Ezeonyejiaku et al., 2012); Cu bis 0,6 mg/L (Ohimain, 2014); Mo bis 0,095 mg/L (*Pangasianodon hypophthalmus*, Yamaguchi et al., 2007) sowie B bis weit über 0,4 mg/L (Barufke et al., 2002; Omofunmi, 2017) nachgewiesen. Arten wie der Afr. Raubwels (*Clarias gariepinus*) gelten daher aufgrund ihrer hohen Robustheit gegenüber Schwankungen dieser Parameter als besonders geeignet für den Einsatz in RAS-Systemen mit angeschlossenen aquap. Einheiten. Um die Toxizität bestimmter Spurenelemente für den Afr. Raubwels zu senken bzw. die Pflanzenverfügbarkeit der Nährstoffe in aquap. Anlagen zu gewährleisten, wird die Wasserhärte auf ein Maß von über 150 mg/L Gesamthärte

angehoben (Ebrahimipour et al., 2010) bzw. werden komplexe Düngemittel wie EDTA oder DTPA in der Aquaponik eingesetzt. So konnte z. B. gezeigt werden, dass eingesetztes EDTA aufgrund seiner lipophobischen Polarität (Nugegoda & Rainbow, 1988) in metallbelasteten Anlagen die Belastung (Cadmium, Cd) des Wassers für den Fisch reduzierte und eine Akkumulation in den Geweben des Afr. Raubwelses verminderte (Ramadan et al., 2011). Anders als lipophobe EDTA-Komplexe besitzen DTPA-Komplexe einen lipophilen Charakter und verhalten sich dementsprechend anders bei einer Aufnahme durch den Fisch. In Studien, die den Fe-DTPA-Komplex aufgrund seiner Vorzüge in Stabilität und Bioverfügbarkeit in Aquaponikanlagen mit *Oreochromis spp.* einsetzen, zeigten sich daher Unterschiede in der Belastung für die Fischarten (Stathopoulou et al., 2018, 2021). So kam es ab einer gewissen Konzentration zur Einlagerung von Fe^{2+} und Veränderungen im Lebergewebe (Stathopoulou et al., 2021). Dies konnte auch in einer eigenen Studie des Autors – die zum ersten Mal den Einsatz von Fe-DTPA am Afr. Raubwels testete – nachvollzogen und bestätigt werden (Hildebrand et al., 2023). Eine Empfehlung für eine Maximalkonz. an Fe-DTPA in der Haltung von *C. gariepinus* wird daher bei 4 mg/L Fe-DTPA getroffen, da nur oberhalb dieses Grenzwertes negative Einflüsse festgestellt werden konnten.

Als eher lichtscheue Art meidet *C. gariepinus* die Exponierung zu grellem Licht (Alsaqufi et al., 2021; Derbalah et al., 2023). Allerdings konnte unter angepassten Lichtverhältnissen (geringe Intensität, optimiertes Farbspektrum) eine Steigerung des Wachstums und eine Verbesserung bezüglich seines Verhaltens erzielt und nachgewiesen werden (Rueda, 2004, S. 46; Almazán-Rueda et al., 2005; Sallehudin et al., 2017; Alsaqufi et al., 2021; Derbalah et al., 2023). Die Aussetzung an eine jeweilige Beleuchtungsintensität scheint darüber hinaus auch mit der Ausprägung von phänotypischen Morphen dieser Art in direktem Zusammenhang zu stehen (Alsaqufi et al., 2021). Ferner wurde *C. gariepinus* ein dichromatisches Sehvermögen attestiert, wonach diese Art grüne und rote Farbtöne unterscheiden kann (Lee et al., 2014). Dies bietet weitere Möglichkeiten zur Effizienzsteigerung moderner Fütterungsmethoden von pelletierten Futtermitteln (Mukai & Lim, 2014) sowie Verbesserungsmöglichkeiten hinsichtlich der Haltungsbedingungen und Produktqualität – z. B. durch eine passende Farbwahl der Anlagenbeleuchtung (Fatollahi & Kasumyan, 2006). Wie viele andere Welsarten besitzt *C. gariepinus* ein hochkomplexes Merkmal, den sog. Weber'schen Apparat (Abbildung 8). Dieser besteht aus bis

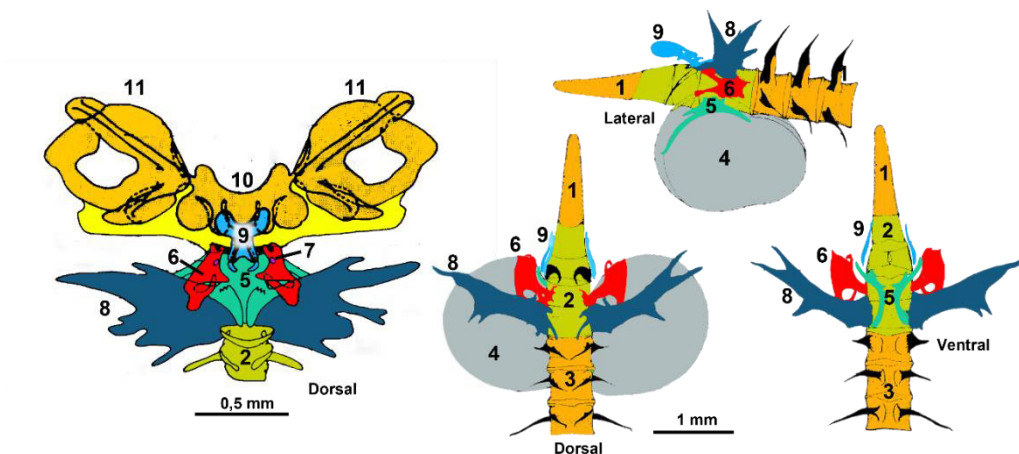


Abbildung 8: Weber'scher Apparat von *Clarias gariepinus* modifiziert nach Radermaker et al. (1989). Links: Vergrößert 21 Tage alte Larve, Rechts: 9 Tage alte Larve. 1: Erster Wirbel, 2: Fusionswirbel (2., 3. und 4. Wirbel zum Komplexwirbelzentrum), 3: Basisdorsalen und Basisventralen der fünften, sechsten und siebten Wirbel, 4: Schwimmblase, 5: OS-Suspensor, 6: Tripus (Gehörknöchelchen), 7: Claustrum (Gehörknöchelchen), 8: Modifizierte Basisventrale des vierten Komplexwirbels, 9: Scaphium (Gehörknöchelchen), 10: Sinus Endolymphaticus (Lymphe), 11: Utriculus (Ohr).

zu vier Komplexwirbeln und ermöglicht dem Wels, durch eine Verbindung seiner Schwimmblase mit dem Innenohr, eine verbesserte akustische Reizwahrnehmung (Radermaker et al., 1989; Chardon et al., 2003; Lechner et al., 2011). Er kann daher nach Popper & Lu, (2000) den Gehörspezialisten zugeordnet werden, wobei die Empfindlichkeit dieser Fähigkeit von der Größe und Anzahl der Komplexwirbel sowie der Größe der Schwimmblase abhängt und sich somit im Laufe der Zeit bei einem heranwachsenden Fisch weiter differenzieren kann (Lechner & Ladich, 2008). Messungen der akustischen Reizschwellen von *C. gariepinus* wurden bislang nicht unternommen, jedoch legen Messungen einer vergleichbaren anatomischen Anordnung bei *Lophiobagrus cyclurus* eine Empfindungsschwelle zwischen 50 Hz und 2 kHz (81,6 dB ref. 1 μ Pa bei 1 kHz) bei jungen und adulten Versuchstieren nahe (Lechner & Ladich, 2008; Lechner et al., 2011).

2. Ziele und Hypothesen

Seit Beginn der Einführung des Afr. Raubwelses *C. gariepinus* auf den europäischen AQ-Markt zu Beginn der 1970er Jahre wurden in der Forschung und Industrie viele Verbesserungen hinsichtlich der allgemeinen Futtermittelzusammensetzung sowie der Wachstumsleistung innerhalb von AQ-Kulturen erforscht und erarbeitet. Mit der Einführung von Technologien zur präzisen Steuerung der Haltungsbedingungen haben sich neue Möglichkeiten in der Aquakultur eröffnet. Ergänzend dazu wurden seit der Jahrtausendwende in der EU verbindliche Standards etabliert, die sowohl das Tierwohl fördern als auch Gesundheits- und Hygienestandards in den Mitgliedstaaten sicherstellen. In den vergangenen zehn Jahren haben sich daraus zusätzliche Schwerpunkte entwickelt, die maßgeblich zur Verbesserung der Produktqualität, des Produktionserfolgs und der Vermarktungsergebnisse aquakultureller Erzeugnisse beitragen. Anlagen, die eine gezielte Manipulation von speziellen Haltungsparametern ermöglichen, bieten heutzutage ein großes Potenzial zur Optimierung einzelner Produktionsschritte in Aufzucht und Haltung von AQ-Organismen. Durch die Berücksichtigung von artspezifischen Bedürfnissen und Grenzwerten (Lichtbedingungen, Fütterungsrhythmus, Besatzdichte, Wasserparameter etc.) und ihrer Anpassung während ihrer Produktion, können Produktionsschritte gezielt optimiert werden. Allerdings bleiben viele dieser Bereiche, wie z. B. die Optimierung der Nährstoffbalance des Kreislaufwassers, gerade in Aquakulturen mit einem Anschluss an eine aquap. Pflanzenkultur oder das Lichtmanagement in Brutstätten, bislang unausgeschöpft.

Ein wesentliches **Ziel dieser Arbeit** ist daher die Identifizierung weiterer Optimierungsmöglichkeiten bei der Haltung der aquakulturrelevanten Spezies *C. gariepinus* in RAS-Anlagen unter besonderer Berücksichtigung externer Einflüsse (Licht, Besatzdichte, chemische Stressoren) sowie deren Potenzial zur Produktions- und Qualitätssteigerung. Hierzu wurden erstmalig – neben einem speziellen Beleuchtungsschema für Brutfische – spezielle chemische Stressoren (Zn-EDTA und Fe-DTPA Düngemittelbestandteile) als potenzielle Zusatzstoffe in gekoppelten RAS-Aquaponikanlagen sowie deren Auswirkungen auf die Gesundheit von Afr. Raubwelsen untersucht. Zudem wurden die Auswirkungen von verschiedenen Besatzdichten und externen Stressoren auf das Fischwachstum und Wohlbefinden getestet. Damit tragen diese Untersuchungen maßgeblich zur Verbesserung zukünftiger Haltungsbedingungen bei – sowohl in regulären Kreislaufanlagen als auch in Verbindung mit der aquap. Pflanzenproduktion. Dabei dienen die folgenden **Arbeitshypothesen** als Grundlage dieser Arbeit:

1. Besatzdichten und externe Stressoren haben einen Einfluss auf das Wachstum und das Wohlbefinden von *C. gariepinus*.
2. Der Fütterungsrhythmus und der Tag/Nacht-Lichtzyklus haben einen Einfluss auf das Wachstum und das Stressniveau von *C. gariepinus*.
3. Fischlarven von *C. gariepinus* zeigen eine Sensibilität gegenüber unterschiedlichen Farbspektren und Lichtintensitäten.
4. Die Zugabe von Zn-EDTA zum Haltungswasser verursacht keine negativen Auswirkungen auf das Fischwohl des Afrikanischen Raubwelses.
5. Afrikanische Raubwelse reagieren sensibel auf die Zugabe von Eisendüngern (Fe-DTPA) im Haltungswasser.

3. Diskussion

In dieser Arbeit wurden weitere Optimierungsmöglichkeiten für die Aufzucht und Haltung des Afr. Raubwelses in kommerziellen AQ-Anlagen identifiziert. Zu diesem Zweck wurden in verschiedenen Versuchsanlagen der Universität Rostock unterschiedliche Entwicklungsstadien (Larven, Setzlinge, Mastfische) in Bezug auf Wachstum, Futterregime, Licht- und Schallstress sowie den Einsatz chemischer Zusatzstoffe untersucht. Dabei standen die Auswirkungen veränderter Haltungsbedingungen auf Leistung und Wohlergehen der Tiere im Mittelpunkt. Die Erkenntnisse dieser Studien werden im Folgenden zusammengetragen und ihre Bedeutung für die Produktion von Afr. Raubwelsen im Kontext zu AQ-Systemen diskutiert.

3.1 Herausforderungen im Besatzdichtenmanagement von Afrikanischen Raubwelsen

In der ersten Studie dieser Arbeit wurde der Einfluss der Besatzdichte auf das Wachstum und das Wohlbefinden von Afr. Raubwelsen untersucht. Als einer der wichtigsten biotischen Faktoren stellt die Besatzdichte eine Grundvoraussetzung für ein ausgeglichenes Wachstum dar und kann darüber hinaus das Stressverhalten und die Gesundheit der Fische beeinflussen (Huang & Chiu, 1997; Li et al., 2021; Wenzel, 2023). Für den Afr. Raubwels wurde dieser Zusammenhang in der ersten Studie dieser Arbeit mit dem Titel „**Effects of stocking density, size, and external stress on growth and welfare of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) in a commercial RAS**“ weiter untersucht.

In Zuchtanlagen zur professionellen Nachzucht von Fischbeständen werden Larven und Jungstadien von Zuchtfischen (z. B. *C. gariepinus*) häufig zu Besatzdichten von 30 Fischen/L bis zu ihrer ersten Sortierung aufgezogen (Pasch, 2022, S. 102; Wenzel et al., 2022). Anschließend gelangen die Jungfische ab einem Gewicht von etwa 300 g in kommerzielle RAS-Anlagen, wo sie zur Mast in Besatzdichten zwischen 200 und 300 kg/m³ bis zu ihrem Schlachtgewicht von etwa 1.500 g gehalten werden (Pasch, 2022, S. 102; Wenzel et al., 2022). Entlang dieses Produktionsabschnittes kommt es dabei zu mehreren Veränderungen seitens der Anforderungen an die Besatzdichte für die Fischbrut. Daher erfordert die Aufzucht von Brutbeständen aquakulturrelevanter Spezies ein großes Maß an Wissen und „Know-How“ über die Biologie und Physiologie der Fischarten sowie über die Optimal- und Grenzwerte der bevorzugten Umweltbedingungen innerhalb jeder Aufzuchtphase. Hierbei können die einflussnehmenden Faktoren in der Fischhaltung in abiotische (physiko-chemische Wasserbedingungen, Beleuchtungswahl, Geräuschkulisse etc.) und biotische (Besatzdichte, Sortierungsgrad, Futterregime etc.) Parameter eingeteilt werden, die je

nach Zuchtfischart den Bedürfnissen der Tiere anzupassen sind. Neben weiteren Parametern in der Fischhaltung gelten schlecht eingestellte Besatzdichten als Ursprung für chronischen Stress und korrelieren oft mit typischen Phänomenen im Fischbestand wie physiologischen Veränderungen, verschiedenen Stressreaktionen und Verschlechterungen des Gesundheitszustands (Montero et al., 1999; Ellis et al., 2002; Carbonara et al., 2020; **Baßmann et al., 2023**). Da sich zudem die Besatzdichte in einer Zuchtgruppe spontan durch Entnahme oder Mortalität in einem Aquakulturbekken verändern kann, wird diese auch als dynamischer Faktor betrachtet, dessen Einfluss in einem Zuchtbecken temporal variieren kann. Wie bereits in Kapitel 1.4.2 (Die Besatzdichte und ihr Einfluss auf die Entwicklung von Zuchtfischen) beschrieben, wird für die Berechnung der Besatzdichte je nach Tierart eine entsprechend praxisnahe Einheit (kg/m^2 ; kg/m^3) verwendet, da z. B. am Boden lebende Fischarten mehr Fläche benötigen als freischwimmende Arten. Als eine am Boden und in der Wassersäule lebende Fischart haben sich für den Afr. Raubwels die Einheiten Fischanzahl/L und kg/m^3 durchgesetzt. Diese werden je nach Entwicklungsstand des Fisches zwischen dem Larvenstadium und ab dem Setzlingstadium verwendet. Die Angabe wird in der Literatur nicht einheitlich verwendet und vernachlässigt dabei häufig die zur Verfügung stehende Bodenfläche innerhalb einer AQ-Anlage.

In dem ersten Experiment dieser Studie, in welchem Afr. Raubwelse zu Besatzdichten von 100, 200 und 400 kg/m^3 gehalten wurden, konnte eine zunehmende Verschlechterung des FCR über die Gesamtlaufzeit des Experiments (23 Wochen) in allen Besatzdichten beobachtet werden (**Baßmann et al., 2023**). Dies ist aufgrund des Auswachsens der Tiere über die Zeit ein normaler Prozess, da sich die Wachstumsleistung bei ausgewachsenen Fischen in natürlichem Maß im adulten Stadium verringert. Dennoch konnten unter den verschiedenen getesteten Besatzdichten Unterschiede festgestellt werden, wobei der schlechteste (höchste) FCR-Wert in der Versuchsgruppe mit der hochintensiven Besatzdichte (400 kg/m^3) und der beste (geringste) Wert in der intensiven (200 kg/m^3) nachgewiesen wurde. Die errechnete mittlere Gewichtszunahme der Fische in dem Experiment unterschied sich jedoch nicht signifikant über die gesamte Aufzuchtzeit. Am Ende des Versuches konnte jedoch ein 13 %iges höheres Wachstum in der semiintensiven (100 kg/m^3) gegenüber der hochintensiven (400 kg/m^3) Besatzdichte festgestellt werden, was den Einfluss der Besatzdichte auf das Fischwachstum beim Afr. Raubwels hervorhebt. Studien, die sich mit der Haltung von *C. gariepinus*-Zuchtstadien im Zusammenhang mit Besatzdichten beschäftigten, zeigten, dass das Wachstum und die Sterblichkeit von Jungstadien des Welses zwischen 100 bis 200 g bei höheren Besatzdichten geringer ausfielen als unter niedrigeren Besatzdichten (Hecht & Appelbaum, 1987; Toko et al., 2007; Van De Nieuwegiessen et al., 2008, 2009). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den Beobachtungen von Wenzel (2023, S. 96). Ältere Wachstumsstadien von *C. gariepinus* wurden in der vorgelegten Studie dagegen mit schlechteren Wachstumsleistungen unter ansteigenden Besatzdichten beschrieben, was den Beobachtungen von Van De Nieuwegiessen et al. (2008, 2009) zu den eigenen Ergebnissen widerspricht. Auch in der Studie von Pasch (2022), die sich mit der Optimierung der Wirtschaftlichkeit in kommerziellen Welszuchten beschäftigte, wurde in einem Experiment festgestellt, dass Raubwelse nach 155 Tagen Mast geringere Wachstumsleistungen zeigten. Der ermittelte Wachstumsunterschied zwischen der intensiven (3,69 kg/m^3) und der extensiven (1,01 kg/m^3) Kulturform betrug jedoch nur etwa 4 %. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Studie anhand der getesteten Besatzdichten keine eindeutige Korrelation zur Mortalität der jeweiligen Wachstumsstadien des Afr. Raubwelses nachgewiesen werden. Somit wurde die höchste Gesamtmortalität unter einer superintensiven Besatzdichte festgestellt, während diese unter intensiven und halbintensiven Besatzdichten niedriger ausfiel (**Baßmann et al., 2023**). Generell kann die Mortalität eines Fischbestands jedoch auch durch die vorliegende Gruppenzusammensetzung, die Anzahl an Vorwüchsern (Fische mit

überdurchschnittlichem Gewicht) und die Ausprägung des Kannibalismus beeinflusst werden und dementsprechend stark variieren (Wenzel et al., 2022; Wenzel, 2023, S. 96). Dies lässt sich nach Wenzel (2023, S. 96) vor allem durch zusätzliche Sortiermaßnahmen präventiv beeinflussen.

Neben dem Einfluss verschiedener höherer Besatzdichten auf das Fischwachstum wurde in der Studie von **Baßmann et al. (2023)** auch deren Einfluss auf die stressassoziierten Konzentrationspiegel von Cortisol, Glukose und Laktat Aufmerksamkeit geschenkt. Hierbei konnte keine Einflussnahme der verschiedenen getesteten Besatzdichten bis 400 kg/m³ auf die Stressindikatoren festgestellt werden. Da die erwartete biochemische Stressreaktion – erkennbar an einem Anstieg der Glukose-, Cortisol- oder Laktatwerte – unter den extremen Besatzdichten ausblieb, vermuteten die Autoren (**Baßmann et al., 2023**), dass möglicherweise eine Hemmung der Cortisolreaktion auf das Stresspotenzial vorlag. Diese könnte durch eine Herunterregulierung des Adrenocorticotropins (ACTH) in der Stressachse der Fische – der sog. Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse, Anhang 10.1.6) – oder der Cortisolrezeptoren bedingt sein, was auf den Einfluss chronischen Stresses zurückzuführen wäre (Wendelaar Bonga, 1997; Van De Nieuwegiessen et al., 2008; **Baßmann et al., 2023**). Obwohl die Konzentrationen von Cortisol, Glukose und Laktat keine Veränderung in den Versuchsgruppen zeigten, konnte die Häufigkeit an auftretenden Bissverletzungen unter den verschiedenen Besatzdichten als vermeintliches Resultat eines verstärkt aggressiven Verhaltens oder einer starken Stressreaktion festgestellt werden. Demnach wurden doppelt so viele Bissverletzungen zu Beginn des Experimentes (Jungfische) in der semi-intensiven Besatzdichte (100 kg/m³) beobachtet, wohingegen diese zum Ende des Experimentes (Altfische) deutlich in den intensiven (200 kg/m³) und hochintensiven (400 kg/m³) Besatzdichten zunahmen. Auch für Jungstadien (0,1–0,3 g) des Afr. Raubwelses wurde in der Literatur eine erhöhte Aggressivität unter geringeren Besatzdichten (> 10–30 Fisch/L) beobachtet (Wenzel et al., 2022), was eine Umstellung zu einer geeigneten Besatzdichte während des Abwachsens der Larven hinein in das Setzlingstadium erforderlich macht (Huntingford et al., 2006). Ein Anstieg an Bissverletzungen wurde – zusammen mit einem Anstieg des Cortisol- und Glukosespiegels – zu einem späteren Zeitpunkt (Versuchsende) in allen Versuchsgruppen beobachtet, als das Experiment von einer starken Geräuschkulisse durch Umbauten am Gebäude tangiert wurde. Die von den Umbauarbeiten ausgehende Geräuschkulisse (> 90 dB) wurde tagsüber über mehrere Tage hinweg erzeugt und sorgte für eine Veränderung des Verhaltens wie Stressreaktionen, vermehrtes Auftreten von Bissverletzungen und der Futterverweigerung bei den Versuchsfischen in den angrenzenden Haltungsbecken (**Baßmann et al., 2023**). Dieser Effekt wurde bereits in der Literatur beschrieben und verweist auf die negative Beeinflussung von Geräuschkulissen – z. B. durch Maschinenbetrieb, Geräteeinsatz sowie Reinigungs- und Wartungsarbeiten – auf das Verhalten, die Gesundheit und das Wohlergehen von Fischen in Zuchtanlagen (Bart et al., 2001; Wysocki et al., 2006; Sierra-Flores et al., 2015; Kunc & Schmidt, 2019; Ksku et al., 2019; Hang et al., 2021). Diese Beeinträchtigung wurde auch in der eigenen Studie durch die zur Überprüfung der Stresstoleranz eingesetzten Biomarkergene hervorgehoben (**Baßmann et al., 2023**). So wurden von den 22 für den Raubwels generierten Biomarkergenen (Anhang 10.2.3) das *slc39a8*-Gen, welches die Zellmigration, Proteintransporter und Zinkhomeostase reguliert (Jeong & Eide, 2013; Wu et al., 2017) und das *mtf1*-Gen, welches die Expression eines Transkriptionsfaktors für die Anpassung an einige Stressbedingungen reguliert (Günther et al., 2012), signifikant durch den auftretenden Lärm beeinflusst. Beide Gene wurden zusammen in Fischen aus gestressten semi-intensiven (100 kg/m³) Zuchtbecken im Vergleich zu ihren ungestressten Versuchsbecken um die Hälfte (*slc39a8*-Faktor 9,7; *mtf1*-Faktor 2,2) herunterreguliert. Die gemeinsame Beeinträchtigung beider Genabschnitte lässt hierbei einen Rückschluss auf eine schlechte Anpassungsfähigkeit gegenüber den ausgesetzten

Stressbedingungen zu. Unter Einbeziehung der genetischen Ergebnisse konnte, neben den aufgenommenen Bissverletzungen und den Messungen zu den Cortisol- und Glukosespiegeln, letztendlich der gesamte Umfang des Stressniveaus der Raubwelse unter industriellen Arbeitsbedingungen in den getesteten Besatzdichten abgebildet werden.

Für die durchgeführte Studie zur Untersuchung der Besatzdichten auf das Wachstum und das Wohlbefinden des Afr. Raubwelses (**Baßmann et al., 2023**) konnte damit eine sich zu dem Wachstum des Fisches zeitlich abhängige Veränderung der optimalen Besatzdichte festgestellt werden. Dies äußerte sich vornehmlich durch auftretende Bissverletzungen und stagnierende Wachstumszahlen in semi-intensiven und hochintensiven Besatzdichten während der Aufzucht. Zudem wurde ein negativer Einfluss von stärkeren Lärmkulissen auf das Stressverhalten, Cortisol und Glukosewerte sowie auf genetische Marker (*slc39a8*, *mtf1*) vermerkt. In diesem Zusammenhang kann die **Arbeitshypothese 1** „*Besatzdichten und externe Stressoren haben einen Einfluss auf das Wachstum und das Wohlbefinden von *C. gariepinus**“ angenommen werden, da die vorliegende Studie von **Baßmann et al. (2023)** den Einfluss von hoch intensiven Besatzdichten sowie den Einfluss von Lärmkulissen auf das Wachstum und das Wohlbefinden der Tiere während der Aufzuchtzeit nachweisen konnte. Daher reiht sich diese Studie mit den in ihr gemachten Beobachtungen zu jenen Studien ein, welche bereits relativ hohe Besatzdichten (≥ 30 Fisch/L) für Larven und Brutfische in der Aufzucht (Kaiser et al., 1995; Van De Nieuwegiessen et al., 2009; Ajani & Jenyo Oni, 2015; Ojonugwa & Solomon, 2017; Wenzel et al., 2022) und leicht verringerte hochintensive Besatzdichten (≤ 400 kg/m³) für Setzlinge und Alttiere in der Mast forderten (Hengsawat et al., 1997; Van De Nieuwegiessen et al., 2009; Pasch, 2022).

3.2 Verbesserungsansätze im Fütterungsmanagement zur Reduzierung der Stressbelastung für *C. gariepinus* – Kulturen in kommerzieller Zucht

In der zweiten Studie dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von zeitlich unterschiedlichen Fütterungen am Tag und in der Nacht auf das Fischwachstum sowie auf die Stressbelastung von *Clarias gariepinus* während des regulären Anlagenbetriebs näher untersucht. In modernen Zuchtanlagen können nicht nur Verbesserungen des Ertrags durch präzise Einstellungen der Umweltbedingungen für den Fischbestand erreicht werden, sondern es kann darüber hinaus aufgrund der hochtechnischen Bauweise auch zu Beeinträchtigungen durch Emissionen von Pumpen, Arbeitsleuchten, Radios oder dem arbeitenden Personal kommen, welche sich negativ auf das Fressverhalten, die Stressreaktionen und letztendlich auch auf das Wachstum des Tierbestandes auswirken können. Für *C. gariepinus* wurde versucht, diese Zusammenhänge in einem Experiment mit dem Titel „**The influence of different feeding time management on the growth and stress response of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchel, 1822) under farming conditions**“ näher zu beleuchten.

Fütterungsstrategien in AQ-Betrieben orientieren sich in der Regel an den Protokollen der Futtermittelhersteller sowie an den für das jeweilige Futter zu erwartenden FCR-Werten für das Fischwachstum. Hierbei wird in regulärem Betrieb einer Aquakulturanlage den Tieren täglich die zu fütternde Menge an Futter – als Prozentsatz des Körpergewichts – in einem entsprechenden Rhythmus oder zu bestimmten Zeiten zugeführt. Auch wenn sich Fische mit ihrem Fressverhalten auf die zeitlichen Fütterungen in einer Anlage durch Konditionierung im gewissen Maße anpassen können, so ist diese Anpassungsfähigkeit auf Grundlage der eigenen Biologie und des Jagdverhaltens oft eingeschränkt, was wiederum eine Anpassung der Fütterungsmethodik erfordert. Nach Schwassmann (1971, S. 308) lassen sich Fische in tagaktive oder nachtaktive Arten einordnen. Dabei würden sich tagaktive Arten überwiegend auf ihr Sehvermögen

und nachtaktive Arten hauptsächlich auf ihren Tastsinn sowie chemische oder elektrische Reize zur Beutejagd verlassen. Wie im Kapitel 1.6 (Der Afrikanische Raubwels *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) in der Aquakultur) hervorgehoben, besitzt der Afr. Raubwels – welcher in natürlicher Umgebung einen Großteil seiner Nahrung in der Dämmerung fängt (Fagbenro, 2001; Dadebo et al., 2014; Momoh & Solomon, 2017) – neben elektrischen und olfaktorischen Sinnesorganen ein gut an dunklere Lichtverhältnisse angepasstes Sehvermögen. Ebenso kann er durch eine Verbindung von der Schwimmblase zu seinen otolithischen Strukturen und dem sog. Weber'schen Apparat sehr gut seine akustische Umwelt wahrnehmen (Radermaker et al., 1989; Chardon et al., 2003; Lechner et al., 2011, Abbildung 8), was ihn zu einem gut angepassten Räuber in seinem natürlichen Lebensraum macht (Hossain et al., 1999). In AQ-Anlagen, in denen *C. gariepinus* bislang kommerziell gezüchtet wurde, werden die Fütterungen täglich zu gewohnten Arbeitszeiten zum Teil unter Lichteinwirkung durchgeführt. Dies erleichtert zwar die Arbeit in den Zuchthallen, entspricht aber nicht den bevorzugten Jagdbedingungen und dem natürlichen Fressverhalten des Fisches. Studien, die die Auswirkungen veränderter Umweltbedingungen in industriellen AQ-Anlagen durch die Licht- und Lärmemissionen untersuchten, identifizierten eine Korrelation zur Expression von Cortisol, Glukose und anderen stressbezogenen Parametern und damit auch zu biologischen Stressreaktionen von *C. gariepinus* unter den gängigen kommerziellen Haltungsbedingungen (Almazán-Rueda et al., 2005; Ellis et al., 2012; Manuel et al., 2016; Baßmann et al., 2017; Mickle & Higgs, 2018).

Weitere Studienergebnisse von Almazán-Rueda et al. (2005) legten anschließend nahe, dass nokturnale (nachtaktive) Arten, die von Lichtstress und Lärm stärker beeinflusst werden als diurnale (tagaktive) Fischarten, nicht nur schlechter in den Anlagen wachsen, sondern auch dass ihre Stressachsen im besonderen Maße auf diese Reizungen über die Ausschüttung und Regulierung von Stresshormonen und Stoffwechselprodukten (Cortisol, Glukose und Laktat) reagierten. Abseits dieser Erkenntnisse kam es in der Vergangenheit auch zu Beobachtungen von Konditionierungserfolgen bei *Clarias gariepinus*, die eine vermeintliche Verträglichkeit von Licht- und Schalleinwirkung während der Fütterungsereignisse andeuteten (Hossain et al., 1999). Nichtsdestotrotz scheint eine artgerechte Haltung von nokturnalen Arten oder Arten, die sehr empfindlich auf Licht- und Lärmeinflüsse reagieren, nur unter Anwendung besonderer Anpassungen in den Zuchtanlagen möglich zu sein. Eine nähere Untersuchung der Stressreaktion – im Zusammenhang mit einer, an die Fischbiologie angelehnten Fütterungsroutine – wurde daher von der zweiten Studie dieser Arbeit angestrebt, um die Frage nach der Stressanfälligkeit unter industriellen Haltungsbedingungen und Licht- sowie Lärmeinfluss zu beantworten.

Im zweiten Experiment dieser Studie wurden Afr. Raubwelse von etwa 100 g bis etwa 300 g in einer RAS-Anlage der Universität Rostock über 83 Tage aufgezogen und zu unterschiedlichen Tageszeiten (Tag, Nacht und Tag & Nacht) mit einheitlichen Futtermengen angefüttert (**Hildebrand et al., 2025**). Zudem wurde zur Tageszeit (09:00 bis 18:00 Uhr) eine Arbeitskulisse in den Hallen der Anlage durch zusätzliche Lichteinwirkung und Lärmemission simuliert, um die tägliche Arbeitsroutine eines AQ-Betriebs nachzustellen. Das Abwachsen der Welse in den drei Versuchsgruppen wurde dabei in regelmäßigen Abständen durch Vermessung dokumentiert und ausgewählte Parameter zur Evaluierung des Stressniveaus (Cortisol, Glukose, Laktat) wurden von dem Fischbestand während der Tageszeit herangezogen und ausgewertet. Die Ergebnisse der zweiten Studie zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Wachstum, sondern eher eine vergleichbare Gewichtszunahme der Fische aus den Versuchsgruppen der Tag- und der Nachtfütterung (6x alle 2 Std.). Lediglich die Fische, welche am Tag und in der Nacht gefüttert wurden (6x alle 4 Std.), zeigten ein leicht angehobenes Endgewicht ($p > 0,05$). Auch die Auswertung der stressassoziierten Parameter Cortisol, Glucose und Laktat ließ auf keine signifikanten Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen schließen. Mit Blick auf die von den

Versuchsfischen erreichte Biomasse konnten somit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden (**Hildebrand et al., 2025**). Dies ist durchaus bemerkenswert, da in vergleichbaren Experimenten von Hossain et al. (1999), Appelbaum & Kamler (2000) und Boerrigter et al. (2016) ein verbessertes Wachstum bzw. gesteigertes Fressverhalten unter abgedunkelten Haltungsbedingungen beobachtet wurde. Selbst die kontroverse Beobachtung von Mustapha et al. (2012), die ein verbessertes Wachstum für Afr. Raubwelse unter starker Ausleuchtung beschrieb, ließ sich nicht anhand der eigenen gewonnenen Ergebnisse stützen. In Bezug auf die gesteigerte Fressaktivität des Afr. Raubwelses zeigte die Studie von Hossain et al. (1999) – in der *C. gariepinus* Kulturfische entweder während der Nacht, des Tages oder zu beiden Tageszeiten gefüttert wurden – einen signifikanten Unterschied in der Futteraufnahme zwischen der Nacht- und der Tag/Nacht-Gruppe. Dabei nahmen die Raubwelse 70 % ihres täglichen Futters in der Nacht zu sich, selbst wenn sie 24 Std. Zugang zu ihrem Futter hatten (Tag/Nacht-Gruppe). Während der Tageszeit (Tag- Gruppe, Futter nur unter Lichteinfluss) verzeichneten Hossain et al. (1999) dagegen einen signifikanten Rückgang der Futteraufnahme. Bemerkenswert war jedoch, dass die Fische in der Tag/Nacht-Gruppe – trotz der Meidung der Futteraufnahme am Tag – mit der Zeit die letzte nächtliche Fütterung am Morgen und die erste nächtliche Fütterung am Abend eines Tages in ihrem Futteraufnahmeverhalten adaptierten. Dieser Befund deutete bereits in der Studie von Hossain et al. (1999) auf eine Konditionierung der Fische in der Tag-/Nacht-Gruppe hin. Somit konnte erstmals – nach den Hinweisen von Bruton (1979b) und Britz & Pienaar (1992) – eine derartige Anpassung des Futteraufnahmeverhaltens beim Afr. Raubwels bestätigt werden. Die eigenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, bei denen keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchsgruppen mit unterschiedlichen Fütterungszeiten festgestellt wurden (**Hildebrand et al., 2025**), stützen diese Beobachtung zusätzlich. Die in dem zweiten Versuch dieser Studie gehaltenen Raubwelse zeigten demnach eine gute Variabilität und Konditionierbarkeit in ihrer Futteraufnahme, sodass das Endgewicht der Tag/Nacht-Gruppe und der Tag-Gruppe keinen signifikanten Unterschied am Versuchsende zeigte (**Hildebrand et al., 2025**). Die erhobenen stressassoziierten Parameter Cortisol, Glukose und Laktat zeigten darüber hinaus weder zwischen den Versuchsgruppen der Tag-, Nacht- und Tag/Nacht-Fütterung noch infolge der erhöhten Geräuschkulisse (Radio) während der Tageszeit signifikante Unterschiede. Dies widerspricht den Beobachtungen von Boerrigter et al. (2016), welche ein Einflusspotenzial von Fütterungen auf das Stressniveau von Fischen hervorhoben, sowie der Studie von López-Olmeda et al. (2012), die niedrigere Laktatwerte bei Raubwelsen – welche in der Nacht gefüttert wurden – vorfanden. Hierbei sollte im Hinblick auf die in der zweiten Studie dieser Arbeit gewonnenen Daten betont werden, dass lediglich die Stressreaktionen während der täglichen Arbeitsroutine (9:00-18:00 Uhr) von den Daten abgebildet wurden und somit keine unabhängige Auswertung zu den verschiedenen Beleuchtungsroutinen oder Geräuschpegeln möglich war. Zudem zeigte die Auswertung von Bissverletzungen an den Versuchsfischen einen relativen Anstieg in den Versuchsgruppen, welche ausschließlich zur Tageszeit bzw. unter der Geräuschkulisse gefüttert wurden. Dies könnte laut Almazán-Rueda et al. (2005), Boerrigter et al. (2016) und Manuel et al. (2016) ein Hinweis für einen Anstieg aggressiven Verhaltens sein, was typischerweise bei photophoben Fischarten unter stärkerer Lichteinwirkung, aber auch bei geräuschempfindlichen Arten bei starker Geräuschkulisse (Bart et al., 2001; Coppola et al., 2006) zu beobachten ist. Die Auswirkungen der verschiedenen Beleuchtungseinstellungen und der Geräuschkulissen auf das Stressniveau der Fische sollten daher noch einmal möglichst unabhängig voneinander in den Versuchsgruppen in weiteren Experimenten untersucht und verifiziert werden.

In der zweiten Studie dieser Arbeit, die sich mit den Auswirkungen unterschiedlicher Fütterungszeiten und der Routinearbeit in AQ-Anlagen befasste, wurden keine signifikanten

Veränderungen beim Endgewicht oder bei stressbedingten Parametern wie Cortisol, Glukose und Laktat bei den Afr. Raubwelsen festgestellt (**Hildebrand et al., 2025**). Angesichts der unerwarteten Ergebnisse für die, als lichtempfindlich bekannte Fischart *C. gariepinus* deuteten sich schnell Hinweise auf einen Konditionierungseffekt im Experiment an. Dieser Effekt schien die Fähigkeit der Fische zur Futteraufnahme stark zu beeinflussen, insbesondere in Bezug auf den erzwungenen Tageslichtrhythmus (Diurnalismus) sowie die verschiedenen Fütterungszeiten. Außerdem wurden die stressbezogenen Parameter nicht von den festgelegten Fütterungszeiten oder der Geräuschkulisse signifikant beeinflusst. Somit kann im Hinblick auf die, von der zweiten Studie vorliegenden Daten die zweite Arbeitshypothese „*Der Fütterungsrythmus und der Tag/Nacht-Lichtzyklus haben einen Einfluss auf das Wachstum und das Stressniveau von C. gariepinus*“ nicht bestätigt werden, da keine signifikanten Unterschiede zu den verschiedenen Fütterungszeiten gefunden wurden. Jedoch sollten die bereits aufgezeigten Zusammenhänge bezüglich des Konditionierungseffekts und der Einfluss einer stärkeren Geräuschkulisse noch einmal unabhängig voneinander für *C. gariepinus* in zukünftigen Studien untersucht werden, um deren Auswirkungen valide einschätzen zu können.

3.3 Einflüsse angepasster Lichtbedingungen und ihr Potenzial zur Verbesserung von industriellen Haltungsbedingungen in kommerziellen Zuchtanlagen

Die dritte Studie dieser Arbeit analysierte, inwiefern verschiedene Beleuchtungseinstellungen im Farbspektrum und in der Lichtintensität das Wachstum und das Verhalten der Larven des Afr. Raubwelses beeinflussen können (**Hildebrand et al., 2024a**). Da die Ausleuchtung und Farbe von Haltungsbecken für Fischarten mit dichromatischem oder polychromatischem Sehvermögen besonders während der Fütterungszeit, aber auch bereits in der Aufzucht von Jungfischen von großer Bedeutung für die Entwicklung und das Wachstum sein kann, wurde dieser Zusammenhang in zwei getrennten Experimenten für Jungfische des Afr. Raubwelses unter dem Titel „**The role of light in the rearing of *Clarias gariepinus* larvae: Effects on behaviour, growth and survival**“ in dieser Arbeit untersucht.

In den vergangenen Jahren wurden weltweit immer mehr Zuchtfische für den Verzehr gezüchtet. Dies geht, wie bereits im Kapitel 1.1. (Die Aquakultur in der Welt, der EU und in Deutschland) dieser Arbeit beschrieben, aus den Zahlen des Bundesamtes für Statistik in Deutschland (DESTATIS), aber auch aus der Statistik des Welternährungsfonds der Vereinten Nationen (FAO) hervor. Mit dem steigenden Konsum an kultiviertem Fisch geht letztendlich auch die Aufstockung und die Vergrößerung der Reproduktion von Fischen und ihren Jungstadien einher, deren besondere Bedürfnisse an Fürsorge und Pflege sich auch in speziellen Haltungsformen und Einstellungen niederschlagen. Bereits seit den frühen 90er-Jahren wurde erkannt, dass eine Anpassung der Lichtverhältnisse in den Haltungsbecken der Zuchtfische Vorteile bei der Futteraufnahme und der Stressausbildung bietet und zuträgliches, artspezifisches natürliches Verhalten begünstigen kann (Westin & Gydemo, 1986; Björnsson et al., 1989; Appelbaum & Kamler, 2000). Erste Studien, die die Auswirkungen von farbigem oder gedimmtem Licht in den Zuchtanlagen von AQ-Fischen testeten, kamen zu dem Ergebnis, dass die Behälterfarbe oder aber die farbliche Ausleuchtung in den Becken die Entwicklung von Brutfischen entscheidend beeinflussen kann (Volpato & Barreto, 2001; Ullmann et al., 2011; Sierra-Flores et al., 2016; Sallehudin et al., 2017; Kawamura et al., 2017a; 2017b; Bastos et al., 2019; Ninwichian et al., 2022). Ebenso wurde der Intensität der Ausleuchtung eine entscheidender Bedeutung zugesprochen (Rueda, 2004; Almazán-Rueda et al., 2005; Mustapha et al., 2014), da diese die Fressaktivität der Fische und dabei deren, vom Tagesrhythmus abhängigen, Hormonhaushalt beeinflusste. In besonderem Maße zeigten sich jedoch photophobe Fischarten sensibel gegenüber der Beleuchtungsintensität und

reagierten oft mit ausgeprägtem stressassoziiertem Verhalten, geringerem Wachstum oder mit erhöhter Mortalität (Hecht & Pienaar, 1993; Appelbaum & McGeer, 1998; Appelbaum & Kamler, 2000; Rueda, 2004, S. 45, 86; Adewolu et al., 2008; Paramanik et al., 2014). Beide Parameter, sowohl das Lichtspektrum als auch die Lichtintensität, scheinen sowohl von Fischart zu Fischart als auch innerhalb der unterschiedlichen Wachstumsstadien einer Art ihre bevorzugten Werte einzunehmen und sollten daher stets den Bedürfnissen des Fischbestandes angepasst werden (Nwosu & Holzlohner, 2000; Sallehudin et al., 2017). Der Afr. Raubwels (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) wird in vielen europäischen Ländern in kommerziellen RAS-Anlagen als Speisefisch gezüchtet und überwiegend in RAS-Anlagen in blauen, grünen oder grauen Haltebecken unter dem Einfluss von weißem Licht von Leuchtstoffröhren oder Halogenlampen gehalten (FAO, 2015, S. 31; Delabbio, 2015; Kolarevic, 2020). Auch in den Nachzuchtbetrieben von Afr. Raubwelsen werden üblicherweise noch keine angepassten Lichtverhältnisse angewendet. Wie schon im Kapitel 1.6. (Der Afrikanische Raubwels *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) in der Aquakultur) dieser Arbeit hervorgehoben, legte eine Studie von Lee et al. (2014) zur Evaluierung der Farbwahrnehmung von *C. gariepinus* Ergebnisse vor, die darauf schließen lassen, dass diese Welsart eine dichromatische Farbwahrnehmung besitzt – also mindestens zwei spektral unterschiedliche Farbbereiche unterscheiden kann. Dies ermöglicht es dem Afr. Raubwels, Futter gezielt auszuwählen und während seiner eingeschränkten tageszeitlichen Aktivität auch nach Beute zu suchen. Zudem wurden unterschiedliche Einstellungen der Lichtintensität von weißem Arbeitslicht an Jungfischen des Raubwelses in verschiedenen Experimenten getestet (Appelbaum & McGeer, 1998; Prokešová et al., 2017; Soeprijanto & Islamy, 2023) und zeigten bei stärkerer Lichtintensität oft negative Auswirkungen auf das Stressverhalten, das Aktivitätsmuster, das kannibalistische Verhalten oder das Wachstum. Ob eine Kombination aus den für *C. gariepinus* am besten geeigneten Lichteinstellungen aus Lichtfarbe und Lichtintensität einen positiven Einfluss auf dessen Haltung in Bezug auf Wachstum und Stressreaktion erreichen kann, wurde in der dritten Studie dieser Arbeit weiter untersucht.

Für die Bearbeitung der oben genannten Fragestellung wurden in jeweils zwei Experimenten Jungfische des Afr. Raubwelses (0,095 g) zu je 600 Tieren in drei gleichen 50 L Aquarien pro Versuchsgruppe gehalten, sodass in den Haltebecken eine Besatzdichte von 12 Fischen/L erreicht wurde (Hildebrand et al., 2024a). Die Jungfische des ersten Experiments wurden im Anschluss zunächst unter einem roten, gelben und blauen Spektrum mit einheitlicher Bestrahlungsstärke gehalten, sodass deren Reaktionen mit Bezug auf Wachstum und Stressreaktionen ausgewertet werden konnte. Im darauffolgenden Experiment wurden die Versuchsgruppen in gleicher Konstellation mit unterschiedlicher Bestrahlungsstärke (0,07, 23,00 oder 70,00 W/m²/nm) des am zuträglichsten Spektrums des ersten Versuchs (gelbes Spektrum) ausgesetzt und die Reaktionen des Fischbestands erneut ausgewertet. Mit Blick auf die Ergebnisse der dritten Studie dieser Arbeit konnten verschiedene negative Auswirkungen durch die getesteten Spektralfarben von rotem (632 nm), gelbem (581 nm) und blauem (455 nm) Licht sowie der getesteten Bestrahlungsstärken von keiner (0,07 W/m²/nm), schwacher (23,00 W/m²/nm) und geringer Beleuchtung (70,00 W/m²/nm) für das Fischverhalten sowie für das Auftreten von Bissverletzungen beobachtet werden. Effekte auf die Sterblichkeit oder das Fischwachstum wurden, wie bereits in der vorherigen zweiten Studie dieser Arbeit, dagegen nicht beobachtet. Die negativen Effekte in dem Verhalten der Fische waren dabei überwiegend durch geringe Schwimmaktivität, stärker ausgeprägtes aggressives Verhalten oder Luftatmung geprägt, was sich negativ auf die allgemeine Haltung bzw. das Stressniveau in dem jeweiligen mit den Fischen besetzten Becken auswirkte. Ähnliche Beobachtungen zu den Auswirkungen der Beleuchtungseinrichtung auf das Fischverhalten wurden zuvor von Appelbaum & Kamler (2000), Sallehudin et al. (2017) und Soeprijanto & Islamy (2023) beschrieben und wiesen damals bereits auf die Wichtigkeit von

Anpassungen der Anlagenbeleuchtung mit der Auswahl der Lichtfarbe/Lichtstärke in der Fischhaltung hin. Auch wenn typische Verhaltensmuster wie das Luftatmen bei Jungfischen von *C. gariepinus* ein anerkanntes Verhaltensmuster für länger anhaltenden Stress zuverlässig abbilden können und auch eng mit Ergebnissen von direkten empirischen Messungen (z. B. Cortisol-Messungen) von Stressreaktionen korrelieren (Van De Nieuwegiessen et al., 2008, 2009), so bilden diese Beobachtungen dennoch eine Sekundärreaktion ab, die für jede Fischart anders ausfallen und interpretiert werden kann und somit immer auf Vergleichbarkeit bzw. Korrelationen zu primären Parametern auf erster Instanz angewiesen ist. Daher sollte der Zusammenhang einzelner Verhaltensmuster zu einer Stressreaktion stets für die verwendete Fischart unabhängig und auf primärer Reaktionsebene (z. B. Cortisol-Konz.) überprüft werden. In der dritten Studie dieser Arbeit wurden daher die Ergebnisse der Verhaltensuntersuchung bei *C. gariepinus* mit denen der Studie von Van De Nieuwegiessen et al. (2009) gegenübergestellt und eingeordnet, um eine Vergleichbarkeit zu den stressassoziierten Cortisolwerten für *C. gariepinus* herzustellen. Eigene erhobene Daten, wie die der Bissverletzungen, bestätigten darüber hinaus – innerhalb beider Experimente – den signifikanten Anstieg einer Stressreaktion unter blauem Spektrum (455 nm) sowie unter stärkerer Beleuchtung (70,00 W/m²/nm), wobei die Quantität an Verletzungen vor allem unter hellerer Beleuchtung stärker ausgeprägt war (**Hildebrand et al., 2024a**). Diese Beobachtung aus den Experimenten verdeutlicht, dass die Intensität der Beleuchtung einen stärkeren Einfluss auf die Stressreaktion des Afr. Welses hat, als das ausgewählte Farbspektrum. Studien, die die Empfindlichkeit des Afr. Raubwelses gegenüber hellerer Beleuchtung zuvor in ihren Ergebnissen hervorhoben (Britz & Pienaar, 1992; Appelbaum & Kamler, 2000; Almazán-Rueda et al., 2004; Rueda, 2004, S. 45; Prokešová et al., 2017) beschrieben in ihren Auswertungen Veränderungen des Verhaltens, Fluchtversuche bis hin zu einer erhöhten Mortalität. Zusammen mit den Ergebnissen der eigenen Versuchsreihe können nun vorangegangene Spekulationen bezüglich des stärkeren Einflusses der Lichtintensität gegenüber dem Farbspektrum auf den Entwicklungsprozess und die Haltungsbedingungen von *C. gariepinus* bestätigt und für eine präzisere Empfehlung herangezogen werden.

In der für die dritte Studie durchgeführten Versuchsreihe, zur Untersuchung der Auswirkungen des Farbspektrums und der Lichtintensität auf Jungfische des Afr. Raubwelses, konnten quantitativ geringere Mengen an Bissverletzungen sowie ein vermindertes Luftatmungsverhalten unter einem ausgewählten gelben Spektrum (581 nm) festgestellt werden (**Hildebrand et al., 2024a**). Zudem belegten weitere Beobachtungen aus der zweiten Teilstudie eine Verringerung an Bissverletzungen sowie eine positive Entwicklung der Schwimmaktivität unter einer abgedunkelten (0,07 W/m²/nm) oder verringerten Lichtintensität (23,00 W/m²/nm). Eine signifikante Beeinflussung des Wachstums oder der Sterblichkeit durch die verschiedenen Lichteinstellungen wurde in beiden Einzelexperimenten der Studie jedoch nicht festgestellt. Mit Blick auf diese Ergebnisse der Lichtversuchsreihe kann die **Arbeitshypothese 3** dieser Arbeit „*Fischlarven von C. gariepinus zeigen eine Sensibilität gegenüber unterschiedlichen Farbspektren und Lichtintensitäten*“ angenommen werden, da es zu einer wesentlichen Beeinträchtigung in der Haltung des Fisches (Verletzungen und Stressreaktionen) kam, welche durch eine gezielte Veränderung dieser Umweltbedingungen (Lichtfarbe, Lichtintensität) hervorgerufen wurde. Eine, aus den bisherigen Studienergebnissen und den eigenen Daten abgeleitete, Haltungsempfehlung für Afr. Raubwelse bezüglich einer kommerziellen Haltungsichte von 12 Fischen/L sähe eine Haltung für Fischbrut unter möglichst geringen, bis komplett abgeschatteten Lichtverhältnissen vor. Unter Berücksichtigung der neuen Erkenntnisse sollte in Aufzuchtanlagen eine Ausleuchtung mit geringer Lichtintensität bei Verwendung eines gelben Lichtspektrums verwendet werden, da sich diese positiv auf das Schwimmverhalten sowie die Anzahl an Bissverletzungen auswirkt und den Bestand an Brutfisch vor kannibalistischen Übergriffen durch Reduzierung der Wunden und

Fraßstellen schützen kann (Hildebrand et al., 2024a). Für ältere Zuchtbestände an Afr. Raubwelsen über 1,5 g könnte eine Ausleuchtung mit geringer Intensität unter einem gelben Spektrum ähnliche Vorteile wie die Reduzierung von Stressreaktionen bieten, da ältere Welse – ähnlich wie ihre jüngeren Artgenossen – auf grelles weißes Arbeitslicht mit hohem Blauanteil mit stress-assoziiertem Verhalten reagieren.

3.4 Einsatzmöglichkeiten für Zn-basierte Mikronährstoffdünger in *C. gariepinus*-Zuchtanlagen mit aquaponischer Kopplung

In der vierten Studie dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von unterschiedlichen Konzentrationen an chelatisierten Zink-Düngebestandteilen (Zn-EDTA) auf das Wachstum und die Gesundheit von verschiedenen Jungstadien des Afr. Raubwelses untersucht (Hildebrand et al., 2024b). Die in diesem Zusammenhang stehende Zugabe von Spurenelementen ist vor allem vor dem Hintergrund der Kopplung zwischen AQ-Anlagen und aquap. Systemen relevant, da so Engpässen bei der Nährstoffversorgung der Kulturpflanzen entgegengewirkt und sogar anspruchsvollere Kulturpflanzen für aquap. Kulturen erschlossen werden können. Gleichwohl dürfen sich potenziell negative Effekte der Nährstoffadditive nicht auf die Lebensmittelqualität des Fischbestandes auswirken und sollten daher durch weitere Untersuchungen für eine erfolgreiche Anwendung in einem gekoppelten aquap. System überprüft werden. Im Rahmen dieser Bewertung wurden die Auswirkungen relevanter Nährstoffkonzentrationen an Zn-EDTA für einen aquap. Kulturpflanzenbestand anhand von zwei Experimenten mit dem Titel „**Effects of Zn-EDTA on Health and Welfare of the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)**“ für den Afr. Raubwels im Folgenden näher untersucht.

Obwohl ressourcenschonende aquap. Produktionssysteme bereits in den späten 1970er Jahren entwickelt wurden, blieben sie lange Zeit von der pflanzenproduzierenden Industrie unbeachtet. Dies war vor allem ihrer Größe in Zusammenhang mit einer verbundenen AQ-Anlage, aber auch den zyklisch schwankenden Nährstoffkonzentrationen durch den Fischbesatz geschuldet, welche für eine planende und großangelegte Zucht von Kulturpflanzen zunächst unattraktiv war (Palm et al., 2018a; Turnsek et al., 2020). Mit der Weiterentwicklung der Systeme und Einführung neuer, für die Aquaponik nutzbarer Fischarten sowie der steigenden Bedeutung von nachhaltiger und regionaler Produktion gewannen aquap. Produktionssysteme in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Aufmerksamkeit. Wie bereits im Kapitel 1.3 (Aquaponik) beschrieben, arbeiten aquap. Systeme oft als Ergänzung zu einem AQ-System und nutzen dabei die Vorteile der Nährstoffanreicherung in dem Prozesswasser des Fischbestandes, um ausgewählte Arten an Pflanzen zu kultivieren. Durch die Versorgung mit dem Prozesswasser einer AQ-Anlage stehen den Kulturpflanzen bereits ein Großteil der Basisnährstoffe zur Verfügung, jedoch sind wesentliche, für die Entwicklung der Pflanzen benötigte Spurenstoffe unterrepräsentiert und sorgen so häufig für Mangelerscheinungen und Produktionseinbußen. In den letzten Jahren wurde daher zunehmend versucht, die klaffenden Nährstofflücken aquap. Systeme systematisch zu schließen. Da der Einsatz von gängigen Düngemittelkomponenten für die in einem Aquaponiksystem lebende Fischfauna häufig mit Nebenwirkungen behaftet ist, wurden bereits in der Vergangenheit verschiedene Verträglichkeitsexperimente unter anderem für N-P-K-Düngemittel (Ajima et al., 2015; Shuhaimi-Othman et al., 2015), K-Düngemittel (Wenzel et al., 2021) und Fe-Düngemittel (Cerozi, 2020) in unterschiedlicher Zusammensetzung und Konzentration für aquap. Anlagen relevante Fischarten wie *Clarias gariepinus* oder *Oreochromis niloticus* durchgeführt. Das in der vierten Studie dieser Arbeit untersuchte Zink-Düngemittel mit einem enthaltenen EDTA-Chelatkomplex ergänzt daher die Anstrengungen bisheriger Arbeiten und zielt darauf ab, das Nährstoffangebot an Spurenelementen für aquap. Kulturpflanzen unter einem Besatz von Afr.

Raubwelsen zu verbessern (**Hildebrand et al., 2024b**). Für die Untersuchung möglicher negativer Auswirkungen von Zn-EDTA auf den Fischbestand wurden in der vierten Studie zwei getrennte Experimente mit verschiedenen Konzentrationen von Zn-EDTA (0-Kontrolle, 0,125, 0,5, 2,0 mg/L Zn-EDTA) rund um den Anwendungsbereich einer aquap. Anlage (0,45 mg/L Zn) auf zwei Wachstumsstadien von *C. gariepinus* (Mittelwerte Gewicht: 0,19 g und 220,00 g) durchgeführt. Dabei lieferten neben gängigen Faktoren wie dem Wachstum und der Sterblichkeit auch histologische, verhaltensbasierte, hämatologische und genetische Untersuchungen präzise Einblicke in die vielschichtigen Reaktionen beider Altersgruppen im Zuge der Exponierung. Die ausgewerteten Ergebnisse beider Telexperimente zeigten jedoch zunächst keine Auswirkungen eines Expositionseffekts auf die Mortalität oder auf das Wachstum der Versuchstiere, selbst unter der jeweiligen höchsten getesteten Konzentration (0,5 mg/L und 2,0 mg/L Zn-EDTA). Dies setzte sich auch in den Ergebnissen der Verhaltensuntersuchungen beider Wachstumsstadien fort, in denen keine langfristigen Beeinflussungen durch das Düngemittel festgestellt werden konnten. Vergleichbare Ergebnisse einer *C. gariepinus*-Mortalität gegenüber definierten Zinkkonzentrationen konnten bislang in der Literatur nur den Beobachtungen von Ololade & Ogini (2009) und Ezeonyejiaku et al. (2012) entnommen werden. Dort zeichneten sich erst bei einer ZnSO₄-Exponierung von bis zu 50 mg/L und einer Exponierungszeit von 96 Std. Anfänge einer steigenden Mortalität im Fischbestand ab. Die Autoren von Ezeonyejiaku et al. (2012) berechneten daraufhin eine untere Toxizitätsgrenze (LC₅-Wert) für *C. gariepinus* gegenüber Zinkdüngemitteln (ZnSO₄) mit einem unteren Grenzwert von 30,943 mg/l. Da in beiden Zn-EDTA-Telexperimenten keine Effekte in Verbindung zu den getesteten Konzentrationsgrenzen (0,5, 2,0 mg/L Zn-EDTA) festgestellt werden konnten, decken sich die Ergebnisse der eigenen Studie mit den Erwartungen zur Mortalität der errechneten Toxizitätsgrenze von Ezeonyejiaku et al. (2012). Auch mit Blick auf das Fischverhalten wurde von einigen Studien bereits die Wirkung von Zn als Calciumblocker in den Kiemen hervorgehoben, welche neben starken Gewebeschäden in den Kiemengeweiben (Hypoxämie, Hyperkapnie, Azidose und Hypokalzämie) weitere Auswirkungen auf das Fischverhalten nahelegten (Skidmore, 1970; Spry & Wood, 1984; Sorensen, 1991, S. 159). Die Ergebnisse beider Zn-EDTA-Teilstudien konnten jedoch keine Veränderung des Verhaltens feststellen, das mit einer Dysfunktion der Kiemen oder einer stressassoziierten Reaktion in Verbindung gebracht werden konnte (Ololade & Ogini, 2009; Chidiebere, 2019), sondern sich in einem normalen, für die Altersstufe typischen Rahmen bewegte (Wenzel et al., 2022; **Hildebrand et al., 2024b**). Der in der Literatur beschriebene Effekt der Hypokalzämie sowie ein mögliches stressassoziiertes Verhalten konnten somit für die Konzentrationsbereiche um 0,5 mg/L Zn-EDTA in beiden Telexperimenten für *C. gariepinus* ausgeschlossen werden. Aus den weiteren Ergebnissen der histologischen Untersuchung, der Immunzellenausählung und der Untersuchung der genetischen Marker der Zn-EDTA-Telexperimente gingen jedoch signifikante Effekte hervor, die zum Teil auf den Einfluss von Zn-EDTA zurückgeführt werden konnten. So wurden in den untersuchten Gewebeproben der Leber und der Kiemen der Raubwelse Veränderungen und Schädigungen (Hyperplasie, Fusion der Sekundärlamellen, Veränderung der Schleimhautzellen sowie Ödeme) festgestellt, die sich unter der höchsten Konzentration von 2,0 mg/l Zn-EDTA am deutlichsten ausprägten und differenzierten (**Hildebrand et al., 2024b**). Im Gegensatz zu den Beobachtungen aus vorherigen Studien, die die Auswirkungen von freiem Zn²⁺ auf unterschiedliche Gewebetypen bei *C. gariepinus* beschrieben (Kotze et al., 1999; Ezeonyejiaku et al. 2010; Awoyemi et al., 2014; Olawusi-Peters et al., 2014; Duran et al., 2015) konnten in beiden untersuchten Gewebetypen dieser Studie keine Anreicherung an Zn festgestellt werden (**Hildebrand et al., 2024b**). Eine Studie von Karayakar et al. (2021), die die Auswirkungen von Zn-Konz. bei *Cyprinus carpio* in Anwesenheit von EDTA untersuchte, beschrieb dagegen eine verminderte Akkumulation von Zn in verschiedenen Geweben. Ebenso konnten Nugegoda & Rainbow (1988),

die sich in ihrer Studie mit der Wirkungsweise von Zn-EDTA in aquatischen Organismen beschäftigten, einen geringeren Akkumulationseffekt des Zn-EDTA-Komplexes auf untersuchte Gewebe bei *Palaemon elegans* nachweisen. Die in der eigenen Studie beobachteten Effekte zu Zn-EDTA stehen somit eher im Zusammenhang mit Studien, die sich mit Zn unter Anwesenheit von EDTA befassten (Nugegoda und Rainbow, 1988; Karayakar et al., 2021), als mit solchen, die die Wirkung freier Zn-Ionen auf aquatische Organismen untersuchten. Eine mögliche Schutzwirkung vor Akkumulation für verschiedene Gewebe kann daher für EDTA-Komplexe spekuliert werden. Jedoch zeigten die negativen Veränderungen des Kiemengewebes unter der vierfachen Zielkonzentration (0,5 mg/L), dass negative Effekte in bestimmtem Umfang möglich sind. Weitere Ergebnisse hochauflösender Methoden sollten daher zur Überprüfung der eigenen Ergebnisse herangezogen werden, um die Auswirkungen auf die Gewebetypen bei *C. gariepinus* besser zu verstehen. Darüber hinaus zeigte die Auswertung der für die Zn-Homöostase relevanten genetischen Marker weitere signifikante Ergebnisse. Unter den 17 getesteten Markergenen zeigten vor allem das *kmt2a*-Gen und das *mtf1*-Gen eine bemerkenswerte Reaktion. Die Hochregulierung des *kmt2a*-Gens unter und zunehmender Zeit konnte – unabhängig zur Zn-EDTA-Konzentration – zusammen mit den Ergebnissen aus der Immunzellenzählung einer Wundheilungsreaktion zugeordnet werden, da zudem die Anzahl von Wunden an den Versuchsfischen gegen Ende des Experimentes zunahm (**Hildebrand et al., 2024b**). Diese Einschätzung der Genaktivität stimmt mit den Erwartungen über die Beteiligung der Methyltransferasen (*kmt2a*-Gens) von Huang et al. (2015), Zheng et al. (2017) und Davis et al. (2023) überein und konnte darüber hinaus keiner direkten Reaktion auf Zn-EDTA zugeordnet werden. Die auffällig insignifikante Regulierung des *mtf1*-Gens unter den eingestellten Konzentrationen von Zn-EDTA (0,5; 2,0 mg/L) deutete dagegen auf eine Inaktivität der Genexpression des Metallothionein-Proteins (MT) hin, das bereits in früheren Studien aufgrund seiner Rolle in der Metallhomöostase und Entgiftung, insbesondere im Lebergewebe, bei vielen Fischarten beschrieben und hervorgehoben wurde (Wimmer et al., 2005; Günther et al., 2012; Chen et al., 2020). Aufgrund der Inaktivität des *mtf1*-Gens in allen untersuchten Zn-EDTA-Versuchsgruppen kann ein Anstieg der freien Zn-Konzentration im Zytosol der Raubwelse (ab einem Gewicht von 220,00 g) ausgeschlossen werden. Ein solcher Anstieg hätte eine Kettenreaktion ausgelöst - darunter die Hochregulierung des *mtf1*-Gens und die Expression des MT-Proteins (Grzywacz et al., 2015), was sich letztendlich auch in den histologischen Untersuchungsergebnissen manifestiert hätte. Der Einfluss von Zn-EDTA auf die Metallhomöostase des Lebergewebes oder auf eine in Verbindung stehende Abwehrreaktion konnte somit nicht durch die untersuchten genetischen Marker bestätigt werden (**Hildebrand et al., 2024b**). Weitere Untersuchungen von Genen, wie die der *zip*-Familie, die für die Expression von Metalltransportproteinen verantwortlich sind (Chen et al., 2020), könnten das Verständnis der Wirkungsweise von Zn-EDTA auf die Zn-Homöostase weiter verbessern und sollten in zukünftigen Studien für *C. gariepinus* untersucht werden.

Die in der vierten Studie dieser Arbeit untersuchten Auswirkungen gegenüber verschiedenen, für die Aquaponik relevanten Zn-Konzentrationen zeigten unter den höchsten getesteten Konzentrationen von 2,0 mg/L (Zn-EDTA) wenige negative Effekte z. B. auf das Kiemengewebe von *C. gariepinus* (**Hildebrand et al., 2024b**). Obwohl unter der aquaponikrelevanten Zielkonzentration von 0,5 mg/L (Zn-EDTA) keine signifikanten Effekte unter den Ergebnissen festgestellt werden konnten, so ist der Einfluss von Zn-EDTA über einen längeren Zeitraum auf die Organe und Gewebetypen weiter unklar und sollte daher Gegenstand zukünftiger wissenschaftlicher Fragestellungen sein. Mit Blick auf die **Hypothese 4** mit dem Titel „Die Zugabe von Zn-EDTA zum Haltungswasser verursacht keine negativen Auswirkungen auf das Fischwohl des Afrikanischen Raubwelses“ muss die Hypothese generell abgelehnt werden, da die Auswirkungen von Zn-EDTA negative Effekte z. B. im Kiemengewebe (Hyperplasie, Fusion der Sekundärlamellen,

Veränderung der Schleimhautzellen sowie Ödeme) unter den getesteten Konzentrationen von 2,0 mg/L zeigten (**Hildebrand et al., 2024b**). Jedoch wurden keine bis nur geringe Auswirkungen unter der für Aquaponikanlagen relevanten Zielkonzentration von 0,5 mg/L nachgewiesen. Daher kann eine Empfehlung zur Einhaltung dieser Konzentrationsschwelle von dieser Arbeit ausgesprochen und der Einsatz von Zn-EDTA als Spurenelementdünger befürwortet werden. Obwohl Zn-Konzentrationen in AQ-Anlagen bereits Werte bis zu 0,413 mg/L erreichen können (Strauch et al., 2018), gelten höhere Konz. von freien, unchelatisierten Zn-Ionen für viele Fischarten als reaktiver (Skidmore, 1970; Mallatt, 1985; Hogstrand et al., 2002; Wood, 2017; M. Awoyemi et al., 2014; Duran et al., 2015; Zheng et al., 2017) und können insbesondere unter einer geringen Wasserhärte (< 125 mg/L Ca, Mg; Viljoen et al., 2003; Kiyani et al., 2013) umfangreiche negative Effekte auf den Fischbestand einer AQ-Anlage ausüben (Bradley & Sprague, 1985; Ebrahimpour et al., 2010; Pourkhabbaz et al., 2011; Kiyani et al., 2013; Choi et al., 2023). Die Vermeidung höherer Konz. von freien Metallionen (wie z. B. Zink, Cadmium, Blei und Zinn) gehört damit zu den routinemäßigen Aufgaben des Anlagenmanagements in AQ-Betrieben.

3.5 Toleranzkonzentrationen für eisenhaltige Mikronährstoffdünger im Aquakulturkreislaufwasser und ihre Auswirkungen auf einen Raubwelsbestand

Abschließend wurden in der fünften und letzten Studie dieser Arbeit die Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen eines Eisendüngemittels (Fe-DTPA) auf das Wachstum und die Gesundheit von verschiedenen Wachstumsstadien des Afr. Raubwelse untersucht (**Hildebrand et al., 2023**). Aufgrund der problematischen Unterversorgung mit Spurenelementen in dem, von Aquaponikanlagen genutzten Prozesswasser werden heutzutage viele verschiedene Lösungsansätze verfolgt, um den daraus resultierenden Mangelercheinungen und dem Minderwuchs der Zuchtpflanzen entgegenzuwirken (Roosta & Hamidpour, 2011; Delaide, 2017b; Tellbüscher et al., 2024). Trotz vieler bekannter Vorzüge von verschiedenen Chelatverbindungen kann die künstliche Versorgung mit Mikronährstoffen des Prozesswassers auch mit Risiken für die Fischgesundheit (Kasozi et al., 2019; Swaleh et al., 2020; Farooq et al., 2023) verbunden sein, welche sich z. B. auf die Belastung der Leber oder das Wachstum auswirken können. Daher wurde dieser Zusammenhang für den Afr. Raubwels gegenüber einem in der Hydroponik häufig eingesetzten Eisen-Chelatkomplex (Fe-DTPA) zum ersten Mal in der Studie „**Effects of Fe-DTPA on Health and Welfare of the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)**“ untersucht.

In der Hydroponik werden heutzutage für die Aufzucht verschiedener Kulturpflanzen unterschiedliche Nährstofflösungen mit verschiedenen Anteilen an Makro- und Mikronährstoffen eingesetzt. Viele der, in hydroponischen Systemen eingesetzten Nährstofflösungen verwenden Salzverbindungen in bestimmter Konzentration, mit denen versucht wird, stabile Wachstumsbedingungen für die Pflanzen zu schaffen (Bittsánszky et al., 2016; Sambo et al., 2019). In hydroponischen und aquap. Systemen dienen nährstoffreiche Lösungen, die häufig durch leicht erhöhte pH-Wert gekennzeichnet sind, oft als Substratersatz. Da sich dadurch die Löslichkeit und Verfügbarkeit von vielen enthaltenen Nährstoffverbindungen verändert, wurden erstmals in hydroponischen Systemen Chelatverbindungen wie Fe-EDTA eingesetzt, um z. B. die Spurenelementverfügbarkeit in den Systemen zu stabilisieren und für Pflanzen verfügbar zu halten. (Hewitt, 1952; Vadas et al., 2007). Industrielle Aquaponikanlagen greifen aufgrund ihres Problems mit unterrepräsentativen Mikronährstoffen und steigenden pH-Werten daher auch auf chelatisierte Verbindungen zurück, um die Nährstoffversorgung ihres Zuchtpflanzenbestandes zu optimieren. Dies findet, wie in Kapitel 1.3 (Aquaponik) dieser Arbeit beschrieben, entweder durch Besprühung der Pflanzen oder eine gezielte Zugabe in das Prozesswasser entkoppelter aquap. Anlagen statt. Dabei kommen bereits aus der Hydroponik bekannte Chelatverbindungen wie

EDTA oder DTPA zum Einsatz. Die Versorgung eines gekoppelten aquap. Systems mit Fe durch seine Zugabe zum Prozesswasser stellt allerdings eine Herausforderung dar. Zum einen kann Eisen aufgrund seines nichtlöslichen Oxidationszustandes (Fe^{3+}) durch Oxidation aus der Lösung ausgefällt werden (Reineke & Schlömann, 2020), zum anderen ist es als metabolisch aktives Element in einem Aquaponiksystem im unmittelbaren Austausch mit dem, in der Lösung lebenden Zuchtfischbestand und kann u. U. deren Gesundheit beeinflussen (De Silva et al., 1996; Aisen, 2001). Mit der Ausfällung des Eisens aus der Nährstofflösung unter leicht alkalischen pH-Werten verlieren die Pflanzen zudem die Möglichkeit, dieses mit ihren Wurzeln effizient aufzunehmen (Bartelme et al., 2018; Yep & Zheng, 2019). Eine Bindung des Fe^{2+} Eisens an einen Chelatkomplex (z. B. DTPA) kann daher dessen Oxidation verhindern und hält dies bis zu einem gewissen pH-Wert pflanzenverfügbar in der Nährlösung (Brown & Mazzarella, 1987; Rakocy, 2012). In einigen Umweltstudien (Remberger & Svenson, 1997; Sillanpää, 1997) wurde aber bereits aufgezeigt, dass Chelatkomplexe, die in Flüsse und Gewässer gelangten, mit einer mittleren Halbwertszeit (Abbaureate) über längere Zeiträume in den Ökosystemen verweilen und zudem von Organismen wie der Fischfauna aufgenommen werden können. Da dieser Sachverhalt für viele der heutzutage verwendeten Chelatkomplexe zutrifft (unterschiedliche Halbwertszeiten) und Fe als chemisches Element zudem an vielen wichtigen Stoffwechselprozessen von Wirbeltieren eine bedeutende Rolle einnimmt, wurden bereits einige Versuche zu der Verwendung von Eisen-Chelatkomplexen in Aquaponikanlagen durchgeführt, um dessen Interaktionspotenzial gegenüber typischen Zuchtfischarten zu untersuchen (Ru et al., 2017; Stathopoulou et al., 2021). Hier zeigten sich charakteristische Symptome wie Einlagerungseffekte und Irritationen in verschiedenen Geweben, z. B. in der Leber oder im Kiemengewebe. Angesichts der Tatsache, dass Afr. Raubwelse ebenfalls in Aquaponikanlagen gehalten werden können und bislang keine vergleichenden Untersuchungen bezüglich ihrer Toleranz gegenüber Fe-DTPA-Konzentrationen durchgeführt wurden, beschäftigte sich die fünfte Studie dieser Arbeit mit der Fragestellung, wie sich unterschiedliche Konz. von Fe-DTPA auf die Gesundheit des Raubwelses auswirken. Dies wurde im Rahmen von zwei Experimenten an zwei Wachstumsstadien dieser Fischart untersucht, um die Toleranz der Fische gegenüber den Konz. jeweils einzuordnen (**Hildebrand et al., 2023**). Hierzu wurden Jungfische des Raubwelses mit 0,23 g Durchschnittsgewicht Konz. von 0,75 oder 3,0 mg/L Fe-DTPA und heranwachsende Raubwelse mit 267,00 g Durchschnittsgewicht Konzentrationen von 3,0 oder 12,0 mg/L Fe-DTPA ausgesetzt. In beiden Experimenten wurden diese Konzentrationen dann mit einer Nullkontrollgruppe ohne Fe-DTPA verglichen. Nach einer Eingewöhnungszeit von 7 Tagen wurden die Auswirkungen der eingestellten Konz. anhand der beobachteten Sterblichkeit und Wachstumsrate des Fischbestandes als auch durch die Untersuchung des Verhaltens (Videoanalyse), von Blutproben (Leukozytenzählungen), von genetischen Markern (metabolische Aktivität) und Organproben (Leber- und Kiemengewebe) bestimmt (**Hildebrand et al., 2023**). Für das Experiment mit den kleinsten Wachstumsstadien (0,23 g) konnten jedoch nur das Wachstum, die Sterblichkeit und das Verhalten analysiert werden, da für weitere Analysen nicht genügend Probenmaterial zur Verfügung stand. Das durch die fünfte Studie ermittelte Wachstum und die Sterblichkeit des untersuchten Fischbestandes zeigten sich jedoch in der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse für beide untersuchten Wachstumsstadien des Raubwelses unbeeinflusst von den verschiedenen getesteten Konz. an Fe-DTPA. Es kam daher zu keinem unerwarteten verringerten Wachstum oder zu einer gesteigerten Mortalität des jeweiligen Fischbestandes der beiden Experimente (**Hildebrand et al., 2023**). Dies entspricht auch den Beobachtungen der Studien von Stathopoulou et al. (2021), welche die pflanzenrelevante Konzentration von Fe-DTPA an Telapien (*Oreochromis spp.*) untersuchten und ebenfalls keine erhöhte Sterblichkeit oder eine Veränderung des Wachstums in einem Experiment feststellen konnten. Ergebnisse der Videoanalysen des 267,00 g Fischbestandes, welche die Auswirkungen

von Fe-DTPA in einem 8-tägigen Rhythmus über 32 Tage untersuchten, zeigten trotz signifikanter Effekte in der agonistischen Aktivität keine Verhaltensänderungen, die explizit auf die Zugabe des Fe-DTPA-Chelatkomplexes zurückzuführen waren (Hildebrand et al., 2023). Eine mögliche

C. gariepinus Leukogramm der Fe-DTPA Studie

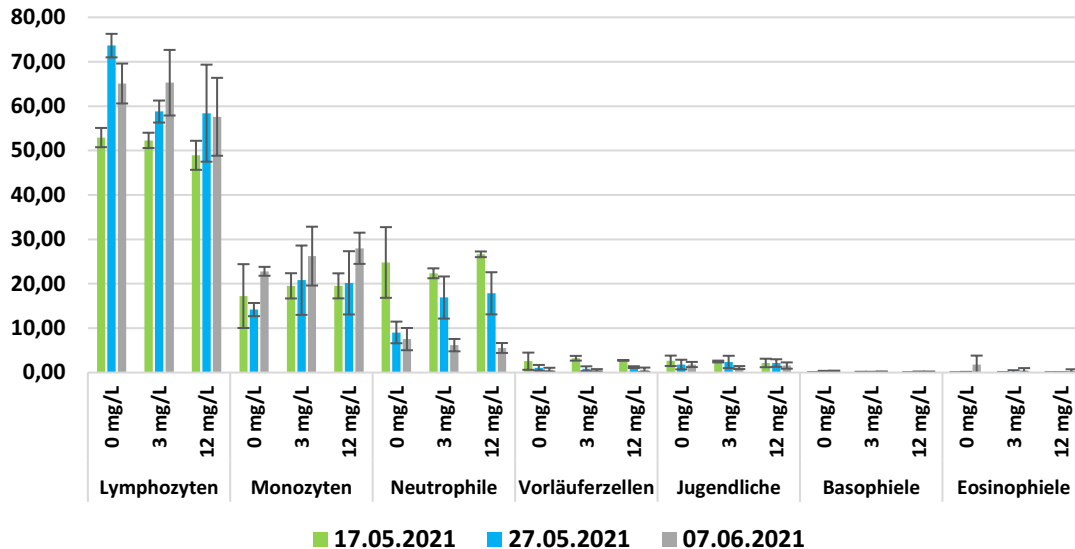


Abbildung 9: *Clarias gariepinus* Leukogramm der Fe-DTPA Studie. Zählungen von je 27 Tieren pro Probezeitpunkt mit jeweils 300 Einzelzählungen. Zahlen der Zellfraktionen in (%).

Erwartung, welche aus der Studie von Ohimain (2014) hervorging, dass durch eine Ausfällung des im Wasser gelösten Eisens (Fe^{2+}) Sauerstoff aus dem Wasser ausgetragen wird und die Welse dadurch gezwungen werden verstärkt an der Oberfläche nach Luft zu schnappen, bestätigte sich jedoch nicht. Dies konnte sowohl in dem Experiment mit 267,00 g schweren Fischen als auch in dem Experiment mit 0,23 g schweren Fischen bestätigt werden. Zusätzliche hämatologische Untersuchungen (Anhang 10.1.7) zeigten, dass bei Raubwelsen mit einem Gewicht von 267,00 g die Fraktion der Monozyten deutlich anstieg (Monozytose), während die Anzahl der neutrophilen Immunzellen sank (Neutropenie). Dies wurde in allen Versuchsgruppen bei der letzten Probenahme nach 32 Tagen festgestellt. Zudem konnte ein leichter Anstieg der Lymphozytenfraktion beobachtet werden (Abbildung 9; Hildebrand et al., 2023). Diese Beobachtung kann auf den Ergebnissen von Clauss et al. (2008) als eine bakterielle Abwehrreaktion bewertet werden, die in unserem Experiment durch das verstärkte Auftreten von Bissverletzungen im Fischbestand hervorgerufen wurde. Die Werte der Immunzellen entsprachen denen vergleichbarer Studien (Gabriel et al., 2004; Bello et al., 2014) und wiesen keine Auffälligkeiten bezüglich der exponierten Fe-DTPA Konzentrationen auf (Hildebrand et al., 2023). Weitere Studien, die die Auswirkungen von Fe-Salzen (z. B. FeSO_4) gegenüber Erythrozyten untersuchten (Siquwepu et al., 2020), konnten erhöhte Hämatokrit- und Hämoglobinwerte gegenüber unbehandelten Tieren nachweisen. Dieser Zusammenhang konnte aber in der vorliegenden Studie nicht für Fe-DTPA bestimmt werden und verbleibt daher als Bestandteil weiterer wissenschaftlicher Fragestellungen für zukünftige Studien. Untersuchungen des Fe-DTPA exponierten Kiemen- und Lebergewebes der Afr. Raubwelse mit 267,00 g Gewicht zeigten besonders unter der Konz. von 12,0 mg/L Fe-DTPA auffällige histologische Veränderungen. So wurden dort neben Fe^{3+} -Einlagerungen und dem Auftreten von Lipidvakuolen in der Leber auch hypertrophische und hyperplasmische Veränderungen der primären und sekundären Lamellen der Kiemen festgestellt (Hildebrand et al., 2023). Hierbei könnten, wie auch bereits innerhalb der Untersuchungen zu Zn-EDTA (Kapitel:

6.4, Publikation: „**Effects of Zn-EDTA ...**“), die polaren Eigenschaften des verwendeten Chelatkomplexes (DTPA) eine nicht zu unterschätzende Rolle bei den beobachteten Auswirkungen gespielt haben. Diese charakterisierende Stoffeigenschaft kann nach der Studie von Nugegoda & Rainbow (1988) und Kathirvel & Richards (2012) für verschiedene Moleküle über deren Transit durch lipophile Membranen wie die des Lebergewebes entscheiden und somit zu einer Anreicherung eines entsprechend strukturierten Moleküls an diesen Orten führen. In den histologischen Befunden der Fe-DTPA Versuchsgruppen zeigten sich daher deutlichere Unterschiede einer Akkumulation des lipophilen DTPA-Komplexes als gegenüber einer Exponierung mit einem lipophoben Zn-EDTA-Chelatkomplex unter gleicher Konzentration. Aufgrund der für die Einschätzung der Akkumulationsrate verwendeten Methodik (Mikroskopie, Klassifizierungshorizont nach Johnson et al. (2009), Anhang 10.2.4) sollten für eine detailliertere Einschätzung dieses Effekts zukünftige Untersuchungen durch eine hochauflösende quantitative Analyse (z. B. ICP-Analyse) ergänzt werden. Die beobachteten Veränderungen in den verschiedenen Geweben sind in diesem Zusammenhang zum ersten Mal beim Afr. Wels gegenüber Fe-DTPA dokumentiert worden und können in gewissem Maße (Schweregrad der Veränderungen: (0) kein Effekt bis (3) moderater Effekt) mit denen von Stathopoulou et al. (2021) verglichen werden. Dort wurden ähnliche Veränderungen des Leber- und Kiemengewebes bei Tilapien (*Oreochromis spp.*) beobachtet, die denen von *C. gariepinus* in der eigenen Studie stark ähnelten. Die beschriebenen Veränderungen des Raubwelses unter den getesteten Konzentrationen bis 12,0 mg/L Fe-DTPA führten, wie auch bei den Tilapien von Stathopoulou et al. (2021) und Kathirvel & Richards (2012), zu keiner Beeinträchtigung der Fischgesundheit durch den Fe-DTPA Chelatkomplex (**Hildebrand et al., 2023**). Dennoch sollten die Auswirkungen einer langfristigen Exponierung in zukünftigen Studien analysiert und ihre Bedeutung für die Fischgesundheit weiter untersucht werden. Mit Blick auf die Auswertung ausgewählter Genabschnitte des Afr. Raubwelses konnte in der vorliegenden Studie zudem keine signifikante Regulation in Abhängigkeit von den eingesetzten Fe-DTPA Konzentrationen festgestellt werden. Aufgrund dessen, dass viele der 34 getesteten Fe sensitiven Genabschnitte keine sichtbare Reaktion auch unter den höchsten Fe-DTPA Konzentrationen (12,0 mg/L) zeigten, wird die Inaktivität der untersuchten Gene aufgrund einer nicht ausreichenden Stimulierung nahegelegt. Gene wie *il6* und *tfa*, die bekannt für ihre Aktivität unter intensiven Stimuli sind, zeigten sich in unserer Untersuchung daher unbeeinflusst (**Hildebrand et al., 2023**). Es kann des Weiteren nicht ausgeschlossen werden, dass Gene, die nicht Bestandteil der Gen-Auswahl dieser Studie waren – wie *tfr1* (Transferrin), *fth1* (Ferritin) oder *hep20* (Hepcidin), welche eine zentrale Rolle in der Regulation der Eisenhomöostase spielen – auf die untersuchten Konzentrationen reagiert hätten. Die Bedeutung dieser, an der Eisenregulation beteiligten Gene wurde von einigen Studien (Andersen, 1997; Kasozi et al., 2019) bereits hervorgehoben und könnte für die weitere Erforschung möglicher Auswirkungen von chelatisierten Eisenverbindungen von entscheidender Bedeutung sein. Die Exponierung von Fe-DTPA sollte daher für weitere Fe sensitive Gene, deren Primer in unserer Studie nicht für den Afr. Wels abgeleitet oder referenziert werden konnten, im Zuge weiterer Experimente erweitert werden.

Mit Blick auf die Ergebnisse der fünften Studie dieser Arbeit, welche die Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen an Fe-DTPA auf zwei verschiedene Wachstumsstadien des Afr. Raubwelses untersuchte, konnten unter den ausgewerteten Parametern signifikante Unterschiede innerhalb der hämatologischen Untersuchung sowie markante Veränderungen im Leber- und Kiemengewebe der Fische mit 267,00 g festgestellt werden (**Hildebrand et al., 2023**). Auch wenn die signifikanten Effekte der Anteile einer Immunzellfraktion der Blutuntersuchung in diesem Zusammenhang eher auf eine Immunantwort im Zuge von Bissverletzungen des untersuchten Fischbestandes hindeuteten, so zeigten sich dennoch keine Auffälligkeiten in der Reaktion aufgrund der Fe-DTPA-Exponierung. Weitere beobachtete Veränderungen im Leber- und

Kiemengewebe konnten anhand einer histologischen Untersuchung bestimmt und mit denen anderer Studien verglichen werden. Hier zeigte sich eine verhältnismäßige Ausprägung der beobachteten Veränderungen, die darüber hinaus unter der angestrebten Zielkonz. von 2,5–3,0 mg/L Fe-DTPA mit keinen drastischen gesundheitlichen Einschränkungen für den untersuchten Fischbestand verbunden waren (**Hildebrand et al., 2023**). Diese Beobachtung kann auch für die Untersuchung des Fischbestandes mit 0,23 g Gewicht bestätigt werden, da dort keine Auffälligkeiten im Rahmen der beobachteten Wachstumsrate, der Sterblichkeit sowie einer Verhaltensanalyse beobachtet werden konnten. Die **fünfte Arbeitshypothese** „*Afr. Raubwelse reagieren sensibel auf die Zugabe von Eisendüngern (Fe-DTPA) im Haltungswasser*“ kann dennoch für die Untersuchungsreihe mit Afr. Raubwelsen angenommen werden, da eine Einflussnahme des Fe-DTPA-Komplexes unter einer erhöhten Konz. (12,0 mg/L) in der histologischen Untersuchung für den Fischbestand mit 267,00 g bestätigt werden konnte (**Hildebrand et al., 2023**). Da nur geringe Veränderungen bei den, für Pflanzen relevanten Eisenkonz. von 2,5 bis 3,0 mg/L festgestellt wurden und der getestete Fe-DTPA-Komplex weder das Verhalten noch die Sterblichkeit der Fische – selbst bei einem Gewicht von 0,23 g – beeinflusste, kann basierend auf den Ergebnissen dieser Studie die Zugabe von Fe-DTPA als Mikronährstoffdünger bis zu einer Konz. von 3,0 mg/L empfohlen werden. Langfristige Expositionen gegenüber dem Fe-DTPA-Komplex in pflanzenrelevanten Konz. sollten weiterhin hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das Leber- und Kiemengewebe des Afr. Raubwelses untersucht werden. Ergänzend könnten erweiterte genetische und hämatologische Methoden die Ergebnisse dieser Studie vertiefen und eine detaillierte Bewertung ermöglichen, um die Unbedenklichkeit von Fe-DTPA für Fischbestände abschließend zu klären.

3.6 Blick in die Zukunft: Nutzen für Fischzüchter mit Aquaponikanlagen

Diese Arbeit hat sich im Rahmen von fünf verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Ansätzen zu Verbesserungsmöglichkeiten in der Aufzucht und Haltung von Afr. Raubwelsen beschäftigt. Vor dem Hintergrund einer weltweit wachsenden Produktionsrate von, in geschlossenen AQ-Anlagen (RAS) produzierten Fischen und dem Bedürfnis nach hoher Produktqualität, Nachhaltigkeit und Tierwohl von Seiten der Kunden beschäftigten sich die Studien dieser Arbeit mit wesentlichen Untersuchungsfeldern aus dem Bereich der Fischproduktion und der Fischhaltung sowie angrenzenden Themenfeldern einer nachhaltigen aquap. Pflanzenproduktion. Dabei sollten Möglichkeiten zur Optimierung der Haltung und Produktion von Afr. Raubwelsen sowie das weitere Zusammenspiel unter dem Wirken eines zugeschalteten Aquaponiksystems untersucht und wesentliche Aspekte zu ihrer Verbesserung herausgearbeitet werden.

- **Aspekt: Besatzdichte**

Für viele fischproduzierende Betriebe ist die gezielte Erhöhung der Fischbesatzdichte ein zentrales Mittel, um die Produktionsmenge und damit den Umsatz des Geschäftsmodells zu steigern. Die enge Verbindung zwischen Besatzdichte, Fischwachstum und Futterverfügbarkeit beeinflusst dabei maßgeblich den Zeit- und Kostenaufwand der Zucht sowie die jährliche Produktionsleistung eines Betriebes. Dass hierbei die Einstellung der Besatzdichte für eine jeweilige Zuchtfischart aber nicht willkürlich getroffen werden kann und Grenzen ausgesetzt ist, wurde bereits in einigen Studien hervorgehoben (Kaiser et al., 1995; Santos et al., 2021; Mugwanya et al., 2022; Pai et al., 2024) und unterstreicht damit noch einmal ihre Bedeutung als biologischer Faktor für die Fischzucht. Wie bereits in den Kapiteln 1.4.2 (Die Besatzdichte und ihr Einfluss auf die Entwicklung von Zuchtfischen) und 6.1 (**Publikation: „Effects of stocking density ...“**)

erläutert wurde, werden in der deutschen und niederländischen Industrie junge Afr. Raubwelse üblicherweise in Besatzdichten von 100–300 kg/m³ und Mastfische zwischen 400 und 500 kg/m³ gehalten (Van de Nieuwegiessen et al., 2009; Tabelle 1). Die Ergebnisse dieser Studie konnten zeigen, dass Jungfische des Afr. Raubwelses (12,0 g Körpergewicht) unter angepassten Lichtverhältnissen und höheren Besatzdichten (≥ 30 Fisch/L) bessere Bedingungen für Fütterungseffizienz und Haltung aufweisen. Für Altfische in der Mastphase (1.500–2.000 g) verschiebt sich dieser Vorteil hingegen zu niedrigeren, weniger intensiven Besatzdichten (≤ 400 kg/m³) in einer RAS AQ-Anlage (Baßmann et al. 2023). Auch andere experimentelle Studien, die sich mit der Optimierung der Besatzdichten dieser Fischart beschäftigten, befürworteten höhere Besatzdichten für Jungfische (96 kg/m³, Dai et al., 2011; ≤ 100 Fischen/L, Haylor, 1991; Ajani & Jenyo Oni, 2015) und Besatzdichten bis zu ≤ 500 kg/m³ für Fische in der Mastphase (Van de Nieuwegiessen et al., 2009) – mahnten jedoch an, dass bei zu geringer Besatzdichte (Jungfische) oder bei einer zu hohen Besatzdichte (Mastfische) nicht nur eine Stagnation des Wachstums, sondern auch physiologische Beeinträchtigungen (z. B. Läsionen) neben einer zunehmenden Belastung durch Disstress unter den Zuchtfischbeständen zu erwarten seien. Diese Bedenken konnten teilweise durch die eigenen Ergebnisse bestätigt werden. Zwar zeigten sich beim Wachstum der Altfische keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Besatzdichten, jedoch gab es deutliche Unterschiede im Habitus durch Bissverletzungen, die bei geringerer Besatzdichte abnahmen (Baßmann et al., 2023). Zudem verstärkte sich das Aggressionsverhalten der Welse unter nicht optimierten Besatzdichten, was sich sowohl in der veränderten Expression bestimmter Gene (slc39a8, mtf1) bei Altfischen als auch in einem Anstieg an Verletzungen bei Alt- und Jungfischen widerspiegelte (Baßmann et al., 2023). Vor diesem Hintergrund widersprechen die Ergebnisse den wirtschaftlichen Empfehlungen und Vorgaben gängiger Produktionsmodelle für AQ-Betriebe, die eine kontinuierliche Maximierung der Biomasse zur Steigerung des Unternehmensabsatzes vorsehen. Die von Pasch & Palm (2021) berechnete Jahresabsatzmenge von 320 t Fisch pro Jahr, welche die wirtschaftliche Tragfähigkeit eines Zuchtbetriebs mit *C. gariepinus*-AQ sichern soll, stellt unter diesen Voraussetzungen für viele kleinere Produktionsbetriebe (≤ 300 m³ Produktionsvolumen) eine Herausforderung dar. Diese verfügen häufig nur über eine begrenzte Anzahl von Haltungsbecken mit ausreichend Volumen, um bei annäherndem Produktionsvolumen eine hochintensive Besatzdichte von ≤ 400 kg/m³ zu realisieren. Dies würde allerdings laut Pasch (2022, S. 102) bei einer Anlage mit nur 300 m³ Produktionsvolumen (unbekanntes einzelnes Produktionstankvolumen) zu einer Verschlechterung der Wirtschaftlichkeit dieser Betriebe führen, was sich nur über geringere Energiekosten oder höhere Verkaufspreise pro kg Fisch lösen ließe. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse sollte der Erhalt der Wirtschaftlichkeit oder das Erreichen der wirtschaftlichen Zielmenge beim Afr. Raubwels jedoch nicht auf Kosten einer drastisch erhöhten Besatzdichte erreicht werden. Wie auch bei anderen Fischarten scheint die optimale Einstellung der Besatzdichte für *C. gariepinus* von zeitlichen Veränderungen betroffen zu sein (Kaiser et al., 1995; Van de Nieuwegiessen et al., 2008, 2009; Dei et al., 2011) und sollte somit dem stetig aktuellen Wissensstand über die optimale Haltung von *C. gariepinus* angeglichen werden, um seine Haltung in Aufzucht- und Mastanlagen nachhaltig und langfristig weiter zu verbessern. In der industriellen Zucht des Afr. Welses sollte darüber hinaus ein Kompromiss zwischen einer hohen Besatzdichte – etwa 30 bis 100 Jungfische pro Liter in Aufzuchtanlagen und 200 bis maximal 400 kg/m³ bei ausgewachsenen Fischen in Mastbetrieben – und dem angestrebten wirtschaftlichen Ertrag angestrebt werden. Gleichzeitig müssen jedoch die Haltungsbedingungen der Wachstumsstadien so ausgestaltet sein, dass negative Auswirkungen wie Verletzungen, Stressreaktionen und unzureichende Platzverhältnisse vermieden werden. Im Fokus der Interessen sollte daher nicht nur die verbesserte Produktqualität – etwa Fische ohne Verletzungen sowie eine verbesserte Filetqualität durch reduzierte

Stressbelastung (Hematyar et al., 2022) – sondern ebenfalls die gesetzlichen Vorgaben des nationalen Tierschutzgesetzes und die damit einhergehenden und zu berücksichtigenden Verpflichtungen für Halter, Pfleger und Züchter dieser Fischart stehen (Kapitel: 1.4.1, Moderne Haltungsbedingungen in der Fischzucht).

- **Aspekt: Fütterungsmanagement**

Weitere wichtige Faktoren mit einer essenziellen Bedeutung für das schnelle Erreichen der Schlachtreife sind neben der Besatzdichte auch die Futterumsatzrate (FCR) der Zuchtfische sowie der angewendete zeitliche Fütterungsrhythmus. Hier konnten die Ergebnisse der eigenen Studie zeigen, dass eine Konditionierung der als photophob geltenden Raubwelse möglich ist und dass diese – trotz ihrer üblichen Aktivitätszeiten – bereit sind, über viele weitere Stunden Futter aufzunehmen (**Hildebrand et al., 2025**). Entgegen der einheitlichen Ergebnislage der eigenen Studie zeigte die Untersuchung von Hossain et al. (1999), dass Afr. Raubwelse in Aufzuchtanlagen einen Großteil ihres Futters über die Nacht und in den ersten und letzten Stunden des Tages aufnehmen. Daraus lässt sich für die Aufzucht und Mast von *C. gariepinus* ein effizientes Fütterungsfenster von 9/15 Stunden zwischen 21:00 und 6:00 Uhr ableiten, welches den natürlichen Bedürfnissen des Fisches gerecht wird. Fütterungszeiten außerhalb dieses Zeitfensters könnten laut den eigenen Ergebnissen ebenfalls durch Konditionierung der Fische in der Mast erreicht werden (**Hildebrand et al., 2025**), würden jedoch potenziell die Wasserqualität beeinträchtigen und zu einem eventuellen höheren Futterverbrauch führen, da die Futteraufnahmebereitschaft der Fische im Tagesverlauf abnimmt. Insbesondere durch ihre überdurchschnittlich gute Futterumsatzrate (FCR) von 0,7 bis 0,8 (Schram et al., 2014; Roques et al., 2015) könnten *C. gariepinus*-Kulturen mit Hilfe einer speziell für den Raubwels angepassten Konditionierungstechnik an zusätzliche Fütterungszeiten gewöhnt werden und somit schneller an ihr Schlachtgewicht herangeführt werden (Anhang 10.2.5). Dies würde die Kosten für Futtermittel und den Wasserverbrauch in seiner Produktion weiter reduzieren und somit die allgemeine Wirtschaftlichkeit von Zuchtanlagen nachhaltig verbessern.

- **Aspekt: Spezielle Haltungsbedingungen**

Die Auswirkungen von speziellen Haltungsbedingungen – wie die Art der Ausleuchtung der Haltebecken oder der Lärmemissionen – auf den Fischbestand einer AQ-Anlage wurden bereits einleitend in den Kapiteln 1.5.1 (Physikalische Haltungsbedingungen) und 1.6 (Der Afrikanische Raubwels *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) in der Aquakultur) beschrieben und konnten anhand der Ergebnisse der eigenen Studien für den Afr. Raubwels nachvollzogen werden (**Baßmann et al., 2023; Hildebrand et al. 2024a, 2025**). Hierbei zeigte sich *C. gariepinus* als sensibel gegenüber greller Lichteinwirkung und reagierte zudem besonders unter blaulastigem Licht (455 nm Blauspektrum) mit Stressreaktionen und einem Anstieg an Bissverletzungen. Auch das Exponieren gegenüber einer stärkeren Schallquelle direkt neben dem Zuchtbecken bzw. das Einwirken eines stark vibrierenden Körpers auf ein Haltebecken beeinflusste das Verhalten der Fische in der eigenen Studie negativ. So führte die übermäßige Exponierung der Fische gegenüber der sich, im Wasserkörper ausbreitenden, Schall- und Vibrationswellen zu Futterverweigerung bis hin zu Panik. Unter Berücksichtigung weiterer Studienergebnisse zur Schallexposition von Zuchtfischen mit spezieller Schallwahrnehmung, wie *Lophiobagrus cyclurus* (Lechner & Ladich, 2008) – zu denen auch der Afr. Raubwels zugeordnet werden kann – sollte daher insbesondere auf stärkere Emissionen (z.B. Vibrationen) geachtet werden, die durch den Betrieb von im Wasser befindlichen Pumpen oder aufwendige Reinigungsarbeiten entstehen können. Um

die Tiere vor diesen Belastungen zu schützen, müssen solche Emissionen gezielt in das Anlagenmanagement einer AQ-Anlage integriert (Kapitel: 1.4.5, Management von Zuchtfischbeständen in Aquakulturanlagen) oder ggf. beim Anlagenbau mitberücksichtigt werden. Aufwendige Reinigungs- oder Wartungsarbeiten könnten daher idealerweise mit Sortierungsprozessen oder der Neubesetzung der Kulturbecken kombiniert werden, um die allostatistische Stressbelastung während der Zucht nicht zusätzlich zu erhöhen. Zudem kann eine Beleuchtung mit geringer Intensität und niedriger Farbtemperatur bzw. gelblastigem Licht (581 nm) unter Berücksichtigung der eigenen Studienergebnisse zu einer Verbesserung in der Haltung der Raubwelse beitragen (**Hildebrand et al., 2024a**). Bei Jungfischen des Afr. Raubwelses führte diese Maßnahme zudem zu einer 44 %igen Reduktion von Bissverletzungen. Somit könnte der Einsatz dieser Beleuchtung in *C. gariepinus*-Kulturen insbesondere die Aufzucht von Setzlingen fördern, indem er dazu beiträgt, Bestandsverluste zu reduzieren. Ob sich dieser Vorteil auch innerhalb der Mastphase erwachsener Tiere auswirkt, bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen. Um dies zu beurteilen sollten weitere Daten aus industriellen Anlagen unterschiedlicher Bauformen erhoben werden, um den Einfluss spezieller Belastungen auf *C. gariepinus*-Kulturen sowie deren Auswirkungen auf Wachstum und Wohlbefinden weiter zu evaluieren.

Die Zugabe chemischer Nährstoffadditive und ihre Auswirkungen als spezielle Haltungsbedingung für einen Kulturbestand erwiesen sich für die getesteten Nährstoffadditive Fe-DTPA und Zn-EDTA hinsichtlich der für *C. gariepinus* relevanten Nährstoffkonzentrationen als unbedenklich (**Hildebrand et al., 2023, 2024b**). Obwohl die getesteten Nährstoffkonz. von 3,0 mg/L Fe-DTPA und 0,5 mg/L Zn-EDTA keine bis nur leichte Veränderungen auf die Zuchtfische ausübten, sollten die Ergebnisse durch zusätzliche Analysen rund um die Fischfleischqualität und mögliche Schäden durch langfristige Exponierungen fortgeführt und ergänzt werden. Im Vergleich zu anderen wirtschaftlich relevanten Fischarten (*Oreochromis niloticus*, *Pangasius hypophthalmus*, *Cyprinus carpio* oder *Oncorhynchus mykiss*) zeigte sich *C. gariepinus* jedoch robust gegenüber vielen der bereits in der Aquaponik getesteten Nährstoffkonz. wie NH_4^+ , K^+ oder PO_4^{2-} und bewies sich nun auch als resilient gegenüber den getesteten Zielkonz. von Eisen- und Zink-Additiven im Zuge der gezielten Aufdüngung von Prozesswasser einer RAS-Anlage. Mit der Möglichkeit, das Kreislaufwasser einer AQ- Anlage für eine aquap. Nutzung weiter aufzubereiten, ohne dass dabei Schädigungen des Fischbestandes zu befürchten sind, eröffnen die Ergebnisse dieser Arbeit neue Möglichkeiten wie aquap. Systeme zukünftig kostengünstig Nutz- und Zierpflanzen produzieren können. Dabei kann in Kreislaufanlagen mit einem ausgewachsenen Fischbesatz das Wasser entsprechend des Pflanzenverbrauchs aufbereitet und in eine aquap. Pflanzkultur geleitet werden. Das rückfließende Wasser, welches über die Zeit durch das Pflanzenwachstum an Nährstoffen verliert, kann in einem Mastsystem ohne weitere Probleme für den Wasserkreislauf weiterbenutzt werden und wird erst mit dem regulären Wasserwechsel ausgetauscht. Eine Folgeaufdüngung sollte dann auf Grundlage der erhobenen chemischen Messwerte in Anpassung an die gewählten Zielkonz. erfolgen, um verbrauchte Nährstofffraktionen auszugleichen und eine partielle Überdosierung einzelner Komponenten zu vermeiden. Die Verwendung von speziell mit Spurennährstoffen angereichertem Prozesswasser kann bereits in AQ-Systemen mit kleineren Zuchtfischen (< 5 g Körpergewicht) verwendet werden, um wirtschaftliche Vorteile in einem aquap. Zuchtbetrieb zu erzielen. In diesem Fall sollte jedoch das rückfließende, vollständig angereicherte Prozesswasser im Verhältnis 1:4 verdünnt werden, um die jungen Fische vor Konzentrationsspitzen kritischer Nährstofffraktionen zu schützen. Da dies technisch sehr aufwendig ist, bietet sich an dieser Stelle eine von der Fischzucht entkoppelte aquap. Pflanzenproduktion an oder eine Produktion von Pflanzen mit geringem Nährstoffbedarf, welche keine stärkere Aufdüngung erfordert. In Zuchtanlagen mit Jungfischen des Afr. Raubwelses (< 5 g Körpergewicht) kann eine nährstoffoptimierte Aquaponikanlage mit gekoppeltem AQ-System bereits

Vorteile bieten – sowohl durch eine Reduzierung des Wasserverbrauchs als auch durch die Möglichkeit, Pflanzen mit geringem Nährstoffbedarf zu kultivieren. In entkoppelten aquap. Systemen mit empfindlichen Jungfischbeständen ist hingegen auch der Anbau von Pflanzen mit höherem Nährstoffbedarf möglich, da das Prozesswasser nicht unmittelbar in das AQ-System zurückgeführt wird. Die Wassereinsparung verringert sich in diesem Fall jedoch auf etwa 25 %, da ein größerer Anteil des Prozesswassers nicht im Kreislauf verbleibt.

Weitere essenzielle Spurennährstoffe für Pflanzen, wie Cu, Mn, Mo und B, müssen noch auf ihre Eignung für *Clarias*-Kulturen getestet werden. Falls sich die chemischen Verbindungen dieser Spurenelemente als verträglich gegenüber Zuchtkulturen des Afr. Raubwelses erweisen, könnten anspruchsvollere Pflanzenarten für den Aquaponikanbau mit dieser Fischart erschlossen werden. Dies würde den wirtschaftlichen Nutzen von AQ-Systemen mit integrierten Aquaponikmodulen steigern und den Betreibern zusätzliche Einnahmequellen erschließen, die aufgrund der hohen Betriebskosten einer AQ-Produktion dringend erforderlich sind.

4. Fazit

Unter Berücksichtigung aller zusammengetragenen Erkenntnisse lässt sich abschließend festhalten, dass für die Zucht des Afrikanischen Raubwelses höhere Besatzdichten von 30 bis 100 Jungfischen pro Liter sowie intensive bis hochintensive Dichten von 200 bis 400 kg/m³ für ausgewachsene Tiere während der Mastphase empfehlenswert sind. Da sich die optimalen Besatzdichten mit zunehmendem Fischwachstum ändern, sollte ihre Anpassung regelmäßig zu einem geeigneten Zeitpunkt (z. B. bei der Bestandssortierung) erfolgen. Eine entsprechende Anpassung des Produktionsmanagements sollte daher für den Raubwels in Betracht gezogen werden, um die Fischhaltung zu verbessern und insbesondere Bissverletzungen zu vermeiden. Da die Sortierung von Fischen in der Industrie mit viel Aufwand verbunden ist, könnte ein vereinfachtes Sortierungsverfahren hier Abhilfe schaffen. So wurde bereits von Wenzel et al. (2022) an einem skalierbaren Verfahren gearbeitet, welches den Sortierungsaufwand im industriellen Betrieb senken und die optimale Produktion der Fische erleichtern könnte. Die Einführung dieser speziellen Sortiermethode in den Wirtschaftssektor bleibt allerdings noch abzuwarten, wäre aber aus Sicht der Welsproduzenten ein wünschenswerter Schritt, um die Fischzucht in diesem Wirtschaftssegment zu stärken.

Da intensive bis hochintensive Besatzdichten nicht nur die eingesetzten technischen Anlagen zur Wasseraufbereitung und Lebenserhaltung in den Kultursystemen an ihre Leistungsgrenzen bringen, sondern auch das Hygienekonzept des Anlagenbetreibers, müssen routinierte Arbeitsabläufe und Protokolle auf einen hohen Fischbesatz abgestimmt und für eventuelle Notfallmaßnahmen vorbereitet sein. AQ-Betriebe, die wenig Erfahrung mit der Aufzucht und Mast von Afr. Raubwelsen besitzen, sollten daher vor dem Hintergrund eines steigenden Verletzungsrisikos unter den Fischen, einer Stagnation des Wachstums und der Probleme bei der Wasseraufbereitung, aber auch aus ethischer Sicht von einer Bewirtschaftung von Raubwelskulturen mit hochintensiven Besatzdichten Abstand nehmen.

Es kann festgehalten werden, dass sich *C. gariepinus* als eine sehr robuste Fischart tolerant gegenüber vielen äußeren Einflüssen sowie chemischen Stressoren gezeigt hat. Seine zudem überdurchschnittliche Futterverwertung und sein rasches Wachstum bei Temperaturen von 25-27°C machen ihn zu einem hervorragenden Zuchtfisch für die Nahrungsmittelherstellung. Allerdings müssen für seine Haltung Faktoren wie die Haltungsdichte, seine Stressanfälligkeit gegenüber Licht- und Schallemissionen sowie die Grenzwerte für spezielle chemische Belastungen von AQ-

Anlagenbetreibern sorgfältig beobachtet und in das Management der Fischzucht eingegliedert werden. Unter Berücksichtigung der, in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse lässt sich durch die Umsetzung eines fischartspezifischen Futterplans – unter Einbeziehung einer an *C. gariepinus* angepassten Konditionierungstechnik (Anhang 10.2.5) sowie einer Empfehlung zur optimalen Haltungsdichte – eine weitere Senkung der Futterkosten erzielen und gleichzeitig eine stressreduzierte Bewirtschaftung des Fischbestands ermöglichen.

Zusätzlich können Zuchtanlagen durch Anpassung ihrer Anlagen (Vermeidung von blaulastigem oder kaltem Licht und starken Vibrationen im Wasserkörper) von einer Verbesserung ihres Zuchtbestandes durch die Reduzierung von Stress profitieren, was sich neben dem Nährwert des Lebensmittels auch durch Umlage für die Tierhaltung auf den Verkaufspreis und die daraus resultierenden Einnahmen auswirkt. Durch Zuschaltung einer gekoppelten oder entkoppelten optimierten aquap. Pflanzenzucht können unter dem Einsatz von speziellen Mikronährstoffdüngern von den produzierenden Betrieben zusätzliche Einnahmen durch die Kultivierung von preiswerten Zier- und Nutzpflanzen erwirtschaftet werden. Die Verknüpfung von AQ-Produzenten, welche Afr. Raubwelse produzieren, mit optimierten Aquaponiksystemen kann die Einnahmen der Betriebe über einen breiteren Absatzmarkt erhöhen und die Rentabilität ihrer Produktion langfristig steigern.

5. Literatuurverzeichnis

- Abbink, W., garcia, A. B., van de Heul, J. W., Gool, A. C. M., Schram, E., & van de Vis, J. W. (2009). De relatie tussen waterkwaliteit en welzijn bij Afrikaanse meerval en tong op Nederlandse viskwekerijen. IMARES. No. C109/09. <https://edepot.wur.nl/143448>
- Adewolu, M. A., Adeniji, C. A., & Adejobi, A. B. (2008). Feed utilization, growth and survival of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) fingerlings cultured under different photoperiods. *Aquaculture*, 283(1–4), 64–67. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.020>
- Adriaens, D., & Verraes, W. (1998). Ontogeny of the osteocranium in the African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell (1822) (Siluriformes: Clariidae): Ossification sequence as a response to functional demands. *Journal of Morphology*, 235(3), 183–237. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4687\(199803\)235:3<183::AID-JMOR2>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(199803)235:3<183::AID-JMOR2>3.0.CO;2-8)
- Agbebi, O. T., Ogunmuyiwa, T. G., & Herbert, S. M. (2013). Effect of Dietary Garlic Source on Feed Utilization, Growth and Histopathology of the African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of Agricultural Science*, 5(5), p26. <https://doi.org/10.5539/jas.v5n5p26>
- Agrillo, C., Miletto Petrazzini, M. E., Piffer, L., Dadda, M., & Bisazza, A. (2012). A new training procedure for studying discrimination learning in fish. *Behavioural Brain Research*, 230(2), 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.025>
- Ahmed, N., & Turchini, G. M. (2021). Recirculating aquaculture systems (RAS): Environmental solution and climate change adaptation. *Journal of Cleaner Production*, 297, 126604. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126604>
- Aisen, P. (2001). Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(10), 940–959. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00063-2)
- Ajani E. K. & Jenyo Oni A. (2015). Growth and Economic Performance of *Clarias gariepinus* Fry Reared at Various Stocking Densities. *Journal of Fisheries & Livestock Production*, 03(02). <https://doi.org/10.4172/2332-2608.1000136>
- Ajima, M., Ogo, O., Akpa, L., & Ajaero, I. (2015). Biochemical and haematological responses in African catfish *Clarias gariepinus* following chronic exposure to NPK (15:15:15) fertiliser. *African Journal of Aquatic Science*, 40(1), 73–79. <https://doi.org/10.2989/16085914.2015.1020046>
- Aksnes, D. L., & Giske, J. (1993). A theoretical model of aquatic visual feeding. *Ecological Modelling*, 67(2–4), 233–250. [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(93\)90007-F](https://doi.org/10.1016/0304-3800(93)90007-F)
- Al-Hafedh, Y. S., Alam, A., & Beltagi, M. S. (2008). Food Production and Water Conservation in a Recirculating Aquaponic System in Saudi Arabia at Different Ratios of Fish Feed to Plants. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(4), 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00181.x>
- Allen, D. M. (1971). Photic control of the proportions of two visual pigments in a fish. *Vision Research*, 11(10), 1077–1112. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(71\)90114-3](https://doi.org/10.1016/0042-6989(71)90114-3)
- Almazán-Rueda, P., Schrama, J. W., & Verreth, J. A. J. (2004). Behavioural responses under different feeding methods and light regimes of the African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. *Aquaculture*, 231(1–4), 347–359. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.016>

- Almazán-Rueda, P., Van Helmond, A. T. M., Verreth, J. A. J., & Schrama, J. W. (2005). Photoperiod affects growth, behaviour and stress variables in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology*, 67(4), 1029–1039. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00806.x>
- Alsaid, M., Daud, H., Mohamed, N., Bejo, S. K., Mohamed, Y., & Abuseliana, A. (2013). Environmental Factors Influencing the Susceptibility of Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis sp.*) to *Streptococcus agalactiae* Infection. *Advanced Science Letters*, 19(12), 3600–3604. <https://doi.org/10.1166/asl.2013.5191>
- Alsaqufi., A. S., Rahman, S. M., Mathew, R. T., Alkhamis, Y. A., Rahman, M. M., & Pathiri, M. A. (2021). Influence of Photoperiod and Shelter on Some Phenotypic Traits in African Catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) Larvae. *Pakistan J. Zool*, 53(4), 1509–1523., 53, 1509–1523.
- Ammar, A. (2009). Effect of initial weight and stocking density on growth performance of mono sex Nile tilapia reared in semi intensive system. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 13(2), 69–80. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2009.2033>
- Ananda Raja, R., & Jithendran, K. P. (2015). Aquaculture Disease Diagnosis and Health Management. In S. Perumal, T. A. R., & P. Pachiappan (Hrsg.), *Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture* (S. 247–255). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2271-2_23
- Andersen, Ø. (1997). Accumulation of waterborne iron and expression of ferritin and transferrin in early developmental stages of brown trout (*Salmo trutta*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 16(3), 223–231. <https://doi.org/10.1023/A:1007729900376>
- Anderson, T., De Villiers, D., & Timmons, M. (2017). Growth and Tissue Elemental Composition Response of Butterhead Lettuce (*Lactuca sativa*, cv. Flandria) to Hydroponic and Aquaponic Conditions. *Horticulturae*, 3(3), 43. <https://doi.org/10.3390/horticulturae3030043>
- Anderson, T. S. (2016). Biological responses of lettuce to hydroponic and aquaponic conditions. Cornell University. Thesis. Master of Engineering.
- Appelbaum, S., & Kamler, E. (2000). Survival, growth, metabolism and behaviour of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) early stages under different light conditions. *Aquacultural Engineering*, 22(4), 269–287. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00054-6)
- Appelbaum, S., & McGeer, J. C. (1998). Effect of diet and light regime on growth and survival of African catfish (*Clarias gariepinus*) larvae and early juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 4(3), 157–164. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1998.00064.x>
- Árnason, T., Magnadóttir, B., Björnsson, B., Steinarsson, A., & Björnsson, B. T. (2013). Effects of salinity and temperature on growth, plasma ions, cortisol and immune parameters of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 380–383, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.036>
- Arthur, J. R., Bondad-Reantaso, M. G., & Cooperation, A. P. E. (2004). Capacity and awareness building on import risk analysis (IRA) for aquatic animals (FWG/01/2002).
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3–4), 199–235. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.001>
- Atlas, W. I., Ban, N. C., Moore, J. W., Tuohy, A. M., Greening, S., Reid, A. J., Morven, N., White, E., Housty, W. G., Housty, J. A., Service, C. N., Greba, L., Harrison, S., Sharpe, C., Butts, K. I. R., Shepert, W. M., Sweeney-Bergen, E., Macintyre, D., Sloat, M. R., & Connors, K. (2021). Indigenous Systems of Management for Culturally and Ecologically Resilient Pacific Salmon (*Oncorhynchus spp.*) Fisheries. *BioScience*, 71(2), 186–204. <https://doi.org/10.1093/biosci/biaa144>

- Awolola, T. M., Areola, J. O., Aladesanmi, T. T., & Arayombo, B. E. (2020). Evaluation of toxicity and response of African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to manganese chloride solution. *Ife Journal of Science*, 22(2), 211–224. <https://doi.org/10.4314/ijss.v22i2.19>
- Awoyemi, O. M., Bawa-Allah K. A. & Otitoloju, A. A. (2014). Accumulation and Anti-oxidant Enzymes as Biomarkers of Heavy Metal Exposure in *Clarias gariepinus* and *Oreochromis niloticus*. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 2(5), 114–122. <https://doi.org/10.12691/aees-2-5-2>
- Badiola, M., Basurko, O. C., Piedrahita, R., Hundley, P., & Mendiola, D. (2018). Energy use in Recirculating Aquaculture Systems (RAS): A review. *Aquacultural Engineering*, 81, 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.03.003>
- Baer, J., George, V., Hanfland, S., Lemcke, R., Meyer, L., & Zahn, S. (2007). Gute fachliche Praxis fischereilicher Besatzmaßnahmen. <https://doi.org/10.4126/98-005095650>
- Baganz, G. F. M., Junge, R., Portella, M. C., Goddek, S., Keesman, K. J., Baganz, D., Staaks, G., Shaw, C., Lohrberg, F., & Kloas, W. (2022). The aquaponic principle—It is all about coupling. *Reviews in Aquaculture*, 14(1), 252–264. <https://doi.org/10.1111/raq.12596>
- Bailey, R. G. (1994). Guide to the fishes of the River Nile in the Republic of the Sudan. *Journal of Natural History*, 28(4), 937–970. <https://doi.org/10.1080/00222939400770501>
- Baldwin, Louise. The effects of stocking density on fish welfare. <https://doi.org/10.24382/BJ18-FB35>
- Balon, E. K. (1995). Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: From Roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture*, 129(1–4), 3–48. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00227-F](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00227-F)
- Baron, V. D., Orlov, A. A., & El'yashev, D. E. (2005). Investigations of electric and acoustic activity of some representatives of the ichthyofauna of South Vietnam. *Ichthyol*, 45, S271–S279., 45, 271–279.
- Barron, J. M., Jensen, N. R., Anders, P. J., Egan, J. P., Ireland, S. C., & Cain, K. D. (2013). Effects of Stocking Density on Survival and Yield of North American Burbot Reared under Semi-Intensive Conditions. *Transactions of the American Fisheries Society*, 142(6), 1680–1687. <https://doi.org/10.1080/00028487.2013.788557>
- Bart, A. N., Clark, J., Young, J., & Zohar, Y. (2001). Underwater ambient noise measurements in aquaculture systems: A survey. *Aquacultural Engineering*, 25(2), 99–110. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(01\)00074-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(01)00074-7)
- Bartelme, R. P., Oyserman, B. O., Blom, J. E., Sepulveda-Villet, O. J., & Newton, R. J. (2018). Stripping Away the Soil: Plant Growth Promoting Microbiology Opportunities in Aquaponics. *Frontiers in Microbiology*, 9, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00008>
- Barufke, K.-P., Grimm-Strele, J., Mader, T., & v.d. Trenck, K. T. (2002). Ableitung einer Geringfügigkeitschwelle zur Beurteilung von Grundwasserverunreinigungen. LUBW. Baden-Württemberg. S. 4; <http://www.fachdokumente.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/91063/> ID Umweltbeobachtung U12-S5-N02
- Bass, A. H., & Clark, C. W. (2003). The Physical Acoustics of Underwater Sound Communication. In A. M. Simmons, R. R. Fay, & A. N. Popper (Hrsg.), *Acoustic Communication* (Bd. 16, S. 15–64). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/0-387-22762-8_2

- Baßmann, B., Brenner, M., & Palm, H. W. (2017). Stress and Welfare of African Catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) in a Coupled Aquaponic System. *Water*, 9(7), 504. <https://doi.org/10.3390/w9070504>
- Baßmann, B., Hahn, L., Rebl, A., Wenzel, L. C., Hildebrand, M.-C., Verleih, M., & Palm, H. W. (2023). Effects of Stocking Density, Size, and External Stress on Growth and Welfare of African Catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) in a Commercial RAS. *Fishes*, 8(2), 74. <https://doi.org/10.3390/fishes8020074>
- Baßmann, B., Harbach, H., Weißbach, S., & Palm, H. W. (2020). Effect of plant density in coupled aquaponics on the welfare status of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(1), 183–199. <https://doi.org/10.1111/jwas.12574>
- Bastos, A. M., Lima, J. F., & Tavares-Dias, M. (2019). Effects of environmental light colors on the larviculture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture International*, 27(5), 1525–1534. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00409-y>
- Bello, O. S., Olaifa, F. E., & Emikpe, B. O. (2014). Haematological and blood biochemical changes in African catfish, *Clarias gariepinus* fed walnut (*Tetracarpidium conophorum* Mull Arg) leaf and onion (*Allium cepa* Linn) bulb supplemented diets. *Am. J. Exp. Agric.* 2014, 4, 1593., 4, 1593.
- Beranek, L. L. (1988). *Acoustical Measurements*. American Institute of Physics. Melville, NY
- Bethe, L. A., Salam, M. A., Fatema, U. K., & Rana, K. S. (2017). Effects of molasses and compost tea as foliar spray on water spinach (*Ipomoea aquatica*) in aquaponics system. *International journal of fisheries and aquatic studies*, 5(3), 203-207., 203–207.
- Beveridge, M. C. M., & Little, D. (2002). The history of aquaculture in traditional societies. In *Ecological Aquaculture: The Evolution of the Blue Revolution*. S. 3–29. Blackwell Science.
- Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., & Linhart, O. (1995). Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129(1–4), 95–112. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00231-C](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00231-C)
- Bittsánszky, A., Uzinger, N., Gyulai, G., Mathis, A., Junge, R., Villarroel, M., Kotzen, B., & Kőmíves, T. (2016). Nutrient supply of plants in aquaponic systems. *Ecocycles*, 2(2). <https://doi.org/10.19040/ecocycles.v2i2.57>
- Björnsson, B. Th., Thorarensen, H., Hirano, T., Ogasawara, T., & Kristinsson, J. B. (1989). Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels, growth, condition factor and hypoosmoregulatory ability of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. *Aquaculture*, 82(1–4), 77–91. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90397-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90397-9)
- Bleckmann, H. (1986). Role of the Lateral Line in Fish Behaviour. In T. J. Pitcher (Hrsg.), *The Behaviour of Teleost Fishes*. S. 177–202. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8261-4_7
- BMEL (2019), *Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2019*. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Bonn, Germany, 2019; p. 47.
- BMEL (2021). *Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2021*; Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL): Bonn, Germany, 2021; p. 49
- NASTAQ (2020), *Nationaler Strategieplan Aquakultur 2021-2030 für Deutschland. Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2021*. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Bonn, Germany, 2021; p. 49.

- Bobe, J., & Labbé, C. (2015). Egg quality in fish: Present and future challenges. *Animal Frontiers*, 5(1), 66–72. <https://doi.org/10.2527/af.2015-0010>
- Boerrigter, J. G. J., Van Den Bos, R., Van De Vis, H., Spanings, T., & Flik, G. (2016). Effects of density, PVC-tubes and feeding time on growth, stress and aggression in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture Research*, 47(8), 2553–2568. <https://doi.org/10.1111/are.12703>
- Boeuf, G., & Le Bail, P.-Y. (1999). Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture*, 177(1–4), 129–152. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00074-5)
- Bolliet, V., Bégay, V., Taragnat, C., Ravault, J. P., Collin, J. P., & Falcón, J. (1997). Photoreceptor Cells of the Pike Pineal Organ as Cellular Circadian Oscillators. *European Journal of Neuroscience*, 9(4), 643–653. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01413.x>
- Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., & Shariff, M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132(3–4), 249–272. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005>
- Bostock, J. (2011). The application of science and technology development in shaping current and future aquaculture production systems. *The Journal of Agricultural Science*, 149(S1), 133–141. <https://doi.org/10.1017/S0021859610001127>
- Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Little, D., Ross, L., Handisyde, N., Gatward, I., & Corner, R. (2010). Aquaculture: Global status and trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2897–2912. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0170>
- Boyd, C. E., & Hanson, T. (2010). Dissolved-oxygen concentrations in pond aquaculture. *Ratio*, 2, 42.
- Boyd, C., & McNevin, A. (2014). *Aquaculture, resource use, and the environment*. John Wiley & Sons.
- Bozoglu, M., Ceyhan, V., Cinemre, A. H., Demiryürek, K., & Kilic, O. (2006). Evaluation of different trout farming systems and some policy issues in the Black Sea region, Turkey. *Journal of Applied Sciences*, 6(14), 2882–2888.
- Bradbury, J. W., & Vehrencamp, S. L. (1998). Chapter 14: Environmental Signals. *Principles of animal communication* (Vol. 132). Sinauer Associates.
- Bradley, R. W., & Sprague, J. B. (1985). Accumulation of zinc by rainbow trout as influenced by pH, water hardness and fish size. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 4(5), 685–694. <https://doi.org/10.1002/etc.5620040512>
- Branson, E. J. (Hrsg.). (2008). *Fish Welfare* (1. Aufl.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470697610>
- Braun, N., De Lima, R. L., Moraes, B., Loro, V. L., & Baldisserotto, B. (2006). Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. *Aquaculture Research*, 37(15), 1524–1531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01589.x>
- Breuer, M. E. G., & Twisk, D. D. (2024). *Aquakulturerzeugung in der EU*. <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/de/sheet/120/aquakulturerzeugung-in-der-eu>
- Bricaud, A., Babin, M., Claustre, H., Ras, J., & Tièche, F. (2010). Light absorption properties and absorption budget of Southeast Pacific waters. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 115(C8), 2009JC005517. <https://doi.org/10.1029/2009JC005517>

- Britz, P. J., & Pienaar, A. G. (1992). Laboratory experiments on the effect of light and cover on the behaviour and growth of African catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae). *Journal of Zoology*, 227(1), 43–62. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1992.tb04343.x>
- Brown, E. R., & Mazzarella, J. D. (1987). Mechanism of oxidation of ferrous polydentate complexes by dioxygen. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 222(1–2), 173–192. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(87\)80285-1](https://doi.org/10.1016/0022-0728(87)80285-1)
- Brown, M. N. (2013). Microbial Resource Management in Indoor Recirculating Shrimp Aquaculture Systems. <https://hdl.handle.net/2027.42/99873>
- Bruton, M. N. (1979a). The breeding biology and early development of *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) in Lake Sibaya, South Africa, with a review of breeding in species of the subgenus *Clarias* (Clarias). *The Transactions of the Zoological Society of London*, 35(1), 1–45. (S.13). <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1979.tb00056.x>
- Bruton, M. N. (1979b). The food and feeding behaviour of *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) in Lake Sibaya, South Africa, with emphasis on its role as a predator of cichlids. *The Transactions of the Zoological Society of London*, 35(1), 47–114. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1979.tb00057.x>
- Bruton, M. (1979c). The survival of habitat desiccation by air breathing clariid catfishes. *Environmental Biology of Fishes*, 4(3), 273–280. <https://doi.org/10.1007/BF00005484>
- Buiteveld, H., Hakvoort, J. H. M., & Donze, M. (1994). Optical properties of pure water (J. S. Jaffe, Hrsg.; S. 174–183). <https://doi.org/10.1117/12.190060>
- Burgess, W. E. (1989). An atlas of freshwater and marine catfishes. A preliminary survey of the Siluriformes. TFH Publication, Neptune City, Canada, 28, 305–325.
- Bye, G. R. (2017). Physio-chemical effects of different CO₂ level in recirculating aquaculture systems (RAS) for Atlantic salmon post-smolt. With focus on heavy metals. Master's thesis, NTNU.
- Calone, R., Pennisi, G., Morgenstern, R., Sanyé-Mengual, E., Lorleberg, W., Dapprich, P., Winkler, P., Orsini, F., & Gianquinto, G. (2019). Improving water management in European catfish recirculating aquaculture systems through catfish-lettuce aquaponics. *Science of The Total Environment*, 687, 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.167>
- Camargo, J. A., Alonso, A., & Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58(9), 1255–1267. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.044>
- Carbonara, P., Alfonso, S., Gai, F., Gasco, L., Palmegiano, G., Spedicato, M. T., Zupa, W., & Lembo, G. (2020). Moderate stocking density does not influence the behavioural and physiological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in organic aquaculture. *Aquaculture Research*, 51(7), 3007–3016. <https://doi.org/10.1111/are.14640>
- Carriquiriborde, P., Handy, R. D., & Davies, S. J. (2004). Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. *Journal of Experimental Biology*, 207(1), 75–86. <https://doi.org/10.1242/jeb.00712>
- Cerozi, B. D. S. (2020). Fulvic acid increases iron bioavailability in aquaponic systems: Theoretical designs and practical considerations to prevent iron deficiency in plants. *Aquacultural Engineering*, 90, 102091. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2020.102091>

- Cerozi, B. D. S., & Fitzsimmons, K. (2016). The effect of pH on phosphorus availability and speciation in an aquaponics nutrient solution. *Bioresource Technology*, 219, 778–781. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.079>
- Cerozi, B. S., & Fitzsimmons, K. (2017). Phosphorus dynamics modeling and mass balance in an aquaponics system. *Agricultural Systems*, 153, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2017.01.020>
- Chardon, M., Parmentier, E., & Vandewalle, P. (2003). Morphology, development and evolution of the Weberian apparatus in catfish. *Catfishes*, 1, 71–120., 1, 71–120.
- Chen, G., Bai, J., Bi, C., Wang, Y., & Cui, B. (2023). Global greenhouse gas emissions from aquaculture: A bibliometric analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 348, 108405. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2023.108405>
- Chen, S.-W., Wu, K., Lv, W.-H., Song, C.-C., & Luo, Z. (2020). Molecular characterization of ten zinc (Zn) transporter genes and their regulation to Zn metabolism in freshwater teleost yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 59, 126433. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.126433>
- Chidiebere, E. E. (2019). Acute Toxicity of Copper and Zinc and their Lethal Concentration on *Clarias Gariepinus* (Cat Fish). *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 17(5). <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2019.17.003076>
- Choi, C. Y., Kim, M. J., Song, J. A., & Kho, K. H. (2023). Water Hardness Improves the Antioxidant Response of Zinc-Exposed Goldfish (*Carassius auratus*). *Biology*, 12(2), 289. <https://doi.org/10.3390/biology12020289>
- Chu, F. L. E. (1996). Laboratory investigations of susceptibility, infectivity and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *Journal of Shellfish Research*, 15(1), 57–66.
- Clarke, R. A., Gallin, J. I., & Kaplan, A. P. (1975). The selective eosinophil chemotactic activity of histamine. *The Journal of Experimental Medicine*, 142(6), 1462–1476. <https://doi.org/10.1084/jem.142.6.1462>
- Clarke, G. L. (1965). Light. In *Elements of Ecology*. S. 185–242. Wiley.
- Clauss, T. M., Dove, A. D. M., & Arnold, J. E. (2008). Hematologic Disorders of Fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(3), 445–462. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.007>
- Colt, J., & Watten, B. (1988). Applications of pure oxygen in fish culture. *Aquacultural Engineering*, 7(6), 397–441. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(88\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0144-8609(88)90003-9)
- Conte, F. S. (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3–4), 205–223. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.003>
- Cooley, M. (2022). *The Perfection of Nature: Animals, Breeding, and Race in the Renaissance*. University of Chicago Press.
- Coppola, C. L., Enns, R. M., & Grandin, T. (2006). Noise in the Animal Shelter Environment: Building Design and the Effects of Daily Noise Exposure. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 9(1), 1–7. https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0901_1
- FAO/NACA, 2012. *Farming the Waters for People and Food*. R.P. Subasinghe, J.R. Arthur, D.M. Bartley, S.S. De Silva, M. Halwart, N. Hishamunda, C.V. Mohan & P. Sorgeloos, (Eds.) *Proceedings of the Global*

Conference on Aquaculture 2010, Phuket, Thailand. 22–25 September 2010. FAO, Rome and NACA, Bangkok. 896 pp. <http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e00.htm>

Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270(1–4), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006>

Craig, S., Helfrich, L. A., Kuhn, D., & Schwarz, M. H. (2017). Understanding fish nutrition, feeds, and feeding. Virginia State University Publications 420-256.

Crampton, V., Bergheim, A., Gausen, M., Naess, A., & Holland, P. (2003). Effects of low oxygen on fish performance, oxygen levels in commercial salmon farming conditions. *EWOS Perspective*, UK Edition, 2, 8-13., 8–13.

Craven, A., Carton, A. G., McPherson, C. R., & McPherson, G. (2009). Determining and quantifying components of an aquaculture soundscape. *Aquacultural Engineering*, 41(3), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2009.07.003>

Curry, C., Krosch, C., & Riera, V. I. (2020). Solving Iron Deficiency with Chelated Iron Applications in Strawberry-Koi Aquaponics Systems.

DAFF, (2018). Department of Agriculture, Forestry and Fisheries. African Sharptooth Catfish Feasibility Study, Final Report. Department of Agriculture, Forestry and Fisheries;

Dadebo, E., Aemro, D., & Tekle-Giorgis, Y. (2014). Food and feeding habits of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Pisces: Clariidae) in Lake Koka, Ethiopia. *African Journal of Ecology*, 52(4), 471–478. <https://doi.org/10.1111/aje.12146>

Dai, W., Wang, X., Guo, Y., Wang, Q., & Ma, J. (2011). Growth performance, hematological and biochemical responses of African catfish (*Clarias gariepinus*) reared at different stocking densities. *African Journal of Agricultural Research*, 6(28). <https://doi.org/10.5897/AJAR11.1278>

Dalzell, D. J. B., & Macfarlane, N. A. A. (1999). The toxicity of iron to brown trout and effects on the gills: A comparison of two grades of iron sulphate. *Journal of Fish Biology*, 55(2), 301–315. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00680.x>

Dauda, A. B., Natrah, I., Karim, M., Kamarudin, M. S., & Bichi, A. U. H. (2018). African Catfish Aquaculture in Malaysia and Nigeria: Status, Trends and Prospects. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 09(01). <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000237>

Davenport, J. (Hrsg.). (2003). *Aquaculture: The ecological issues*. Blackwell Science. ISBN: 1-40511-241-7

Davis, K., Sheikh, T., & Aggarwal, N. (2023, May). Emerging molecular subtypes and therapies in acute lymphoblastic leukemia. In *Seminars in Diagnostic Pathology* (Vol. 40, No. 3, pp. 202-215). WB Saunders.

De Jong, K., Forland, T. N., Amorim, M. C. P., Rieucan, G., Slabbekoorn, H., & Sivle, L. D. (2020). Predicting the effects of anthropogenic noise on fish reproduction. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 30(2), 245–268. <https://doi.org/10.1007/s11160-020-09598-9>

De Moor, I. J., & Bruton, M. N. (1988). Atlas of alien and translocated indigenous aquatic animals in southern Africa. A report of the Committee for Nature Conservation Research National Programme for Ecosystem Research. South African Scientific Programmes Report No. 144. 310 p.

- De Silva, D. M., Askwith, C. C., & Kaplan, J. (1996). Molecular mechanisms of iron uptake in eukaryotes. *Physiological Reviews*, 76(1), 31–47. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.1.31>
- De Silva, S. S., & Anderson, T. A. (1994). *Fish nutrition in aquaculture*. (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Delabbio, J. (2015). LED lighting technology provides unique benefits for aquaculture. *Global Aquaculture Advocate*, Global Seafood Alliance 2025. <https://www.globalseafood.org/advocate/led-lighting-technology-benefits-aquaculture/?headlessPrint=AAAAPIA9c8r7gs82oWZBA>
- Delaide, B. (2017b). A study on the mineral elements available in aquaponics, their impact on lettuce productivity and the potential improvement of their availability. (Dissertation). Universite de Liege (Belgium) ProQuest Dissertations & Theses, 2017. 31351168.
- Delaide, B., Delhay, G., Dermience, M., Gott, J., Soyeurt, H., & Jijakli, M. H. (2017a). Plant and fish production performance, nutrient mass balances, energy and water use of the PAFF Box, a small-scale aquaponic system. *Aquacultural Engineering*, 78, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2017.06.002>
- Derbalah, A., El-Gendy, S. A. A., Alsafy, M. A. M., & Elghoul, M. (2023). Micro-morphology of the retina of the light-adapted African catfish (*Clarias gariepinus*). *Microscopy Research and Technique*, 86(2), 208–215. <https://doi.org/10.1002/jemt.24252>
- Destatis. Deutsches Statistisches Bundesamt. (2020) Land und Forstwirtschaft, Fischerei. Erzeugung in Aquakulturbetrieben 2019.
- Destatis. Deutsches Statistisches Bundesamt. (2021a) Land und Forstwirtschaft, Fischerei. Erzeugung in Aquakulturbetrieben 2020.
- Destatis. Deutsches Statistisches Bundesamt. (2021b). Pressemitteilung Nr.265 vom 8. Juni 2021. Knapp 9 % weniger Aquakulturbetriebe 2020.
- Di Palma, L., & Mecozzi, R. (2007). Heavy metals mobilization from harbour sediments using EDTA and citric acid as chelating agents. *Journal of Hazardous Materials*, 147(3), 768–775. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.01.072>
- Diana, J. S., Egna, H. S., Chopin, T., Peterson, M. S., Cao, L., Pomeroy, R., Verdegem, M., Slack, W. T., Bondad-Reantaso, M. G., & Cabello, F. (2013). Responsible Aquaculture in 2050: Valuing Local Conditions and Human Innovations Will Be Key to Success. *BioScience*, 63(4), 255–262. <https://doi.org/10.1525/bio.2013.63.4.5>
- Diver, S., & Reinhart, L. (2000). Aquaponics Integration of Hydroponics with Aquaculture. ATTRA National Sustainable Agriculture Information Service, 28. IP163.
- Dolomatov, S., Zukow, W., & Skomarovskiy, D. (2011). Features nitrogen metabolism fish and methods neutralize the product of nitrogen metabolism fish aquaculture. 1(3), *Journal of Health Sciences*, 13.
- Downing, G. (2002). Impact of spectral composition on larval haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L., growth and survival: Light quality effects on haddock growth, survival. *Aquaculture Research*, 33(4), 251–259. <https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2002.00668.x>
- Drake, S. L., Drake, M. A., Sanderson, R., Daniels, H. V., & Yates, M. D. (2010). The effect of purging time on the sensory properties of aquacultured southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Journal of Sensory Studies*, 25(2), 246–259. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2009.00255.x>

Duran, S., Tunçsoy, M., Yeşilbudak, B., AyC., Ö., Cici, B., & Erdem, C. (2015). Metal accumulation in various tissues of *Clarias gariepinus* exposed to copper, zinc, cadmium and lead singly and in mixture. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(12C), 4738–4742., 24, 4738–4742.

Durchführungsbeschluss (EU) 2015/1554 der Kommission vom 11. September 2015 mit Durchführungsbestimmungen zur Richtlinie 2006/88/EG hinsichtlich der Anforderungen an die Überwachung und der Diagnosemethoden (Bekanntgegeben unter Aktenzeichen C(2015) 6188),. ABl. L 247/5 vom 23.9.2015, S. 1–62. ELI: http://data.europa.eu/eli/dec_impl/2015/1554/oj

Durchführungsverordnung (EU) 2021/1165 der Kommission vom 15. Juli 2021 über die Zulassung bestimmter Erzeugnisse und Stoffe zur Verwendung in der ökologischen/biologischen Produktion und zur Erstellung entsprechender Verzeichnisse. ABl. L 253 vom 16/07/2021, p. 13–48.

Dytham, C., & Simpson, S. (2007). Elevated mortality of fish larvae on coral reefs drives the evolution of larval movement patterns. *Marine Ecology Progress Series*, 346, 255–264. <https://doi.org/10.3354/meps07039>

Ebrahimpour, M., Alipour, H., & Rakhshah, S. (2010). Influence of water hardness on acute toxicity of copper and zinc on fish. *Toxicology and Industrial Health*, 26(6), 361–365. <https://doi.org/10.1177/0748233710369123>

Eck, M., Körner, O., & Jijakli, H. (2019). Nutrient Cycling in Aquaponics Systems. In *Aquaponics Food Production Systems, Combined Aquaculture and Hydroponic Production Technologies for the Future*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15943-6_9

Elalouf, H., Kaspi, M., Elalouf, A., & Halachmi, I. (2018). Optimal operation policy for a sustainable recirculation aquaculture system for ornamental fish: Simulation and response surface methodology. *Computers & Operations Research*, 89, 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.cor.2017.05.002>

Ellis, T., North, B., Scott, A. P., Bromage, N. R., Porter, M., & Gadd, D. (2002). The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 61(3), 493–531. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb00893.x>

Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., & Martins, C. I. M. (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 163–188. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9568-y>

Emmanuel, O., Chinenye, A., Oluwatobi, A., & Peter, K. (2014). Review of aquaculture production and management in Nigeria. *American journal of experimental agriculture*, 4(10), 1137–1151.

Ernst, D. H., Bolte, J. P., & Nath, S. S. (2000). AquaFarm: Simulation and decision support for aquaculture facility design and management planning. *Aquacultural Engineering*, 23(1–3), 121–179. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00045-5)

Espinal, C. A., & Matulić, D. (2019). Recirculating aquaculture technologies. In *Aquaponics food production systems*. 1, 35–76.

Estensen, B. A. (2021). The impact of redox reactions on the N-and P-cycle in recirculating aquaculture system. Master's thesis, NTNU. <https://hdl.handle.net/11250/2785485>.

EUMOFA. (2020). The EU Fish Market – 2020 Edition. European Commission. <https://doi.org/doi:10.2771/664425>

EUMOFA. (2021). The EU Fish Market – 2020 Edition. European Commission. <https://data.europa.eu/doi/10.2771/563899>.

Europäischer Rechnungshof. (2023). Aquakulturpolitik der EU: Stagnierende Produktion und unklare Ergebnisse trotz höherer EU-Förderung. Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2865/127626>

Eurostat. (2023). Aquakulturproduktion ohne Aufzucht- und Brutanlagen (ab 2008). Database: Fish_aq2a vom 19.09.2023, 23:00. Database. https://ec.europa.eu/eurostat/data-browser/view/fish_aq2a/default/table?lang=de

Evans, B. I., & Browman, H. I. (2004). Variation in the Development of the Fish Retina. In American Fisheries Society Symposium (Vol. 40, pp. 145-166)., 40, 145–166.

Ezeonyejiaku, C. D., Obiakor, M. O., Ezenwelu, C. O., & Ugochukwu, G. C. (2012). Lethal influence of zinc exposure to *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822, Pisces, Clariidae). Journal of Animal Science Advances, 2(1), 177-183., 2, 177–183.

Fagbenro & Davies. (2001). Use of soybean flour (dehulled, solvent-extracted soybean) as a fish meal substitute in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822): Growth, feed utilization and digestibility. Journal of Applied Ichthyology, 17(2), 64–69. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2001.00252.x>

FAO. (2015). African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) production with special reference to temperate zones: A manual, by Andras Peteri, Thomas Moth-Poulsen, Eva Kovacs, Imre Toth and Andras Woyнарovich. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

FAO. (2020). Fishery and aquaculture statistics. Global aquaculture production 1950–2018 (FishstatJ). FAO Fisheries Division, Rome

FAO. (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

FAO, OIE - World Organisation for Animal Health, & Weltgesundheitsorganisation (Hrsg.). (2006). The Control of neglected zoonotic diseases: A route to poverty alleviation, report of a joint WHO/DFID-AHP meeting, 20 and 21 September 2005, WHO Headquarters, Geneva, with the participation of FAO and OIE. World Health Organization.

Farooq, A., Verma, A. K., Hittinahalli, C. M., Harika, N., & Pai, M. (2023). Iron supplementation in aquaculture wastewater and its effect on the growth of spinach and pangasius in nutrient film technique based aquaponics. Agricultural Water Management, 277, 108126. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2022.108126>

Fatollahi, M., & Kasumyan, A. O. (2006). The study of sensory bases of the feeding behavior of the African catfish *Clarias gariepinus* (Clariidae, Siluriformes). Journal of Ichthyology, 46(S2), S161–S172. <https://doi.org/10.1134/S0032945206110051>

Fawole, O. O., Ogundiran, M. A., Ayandiran, T. A., & Olagunju, O. F. (2007). Proximate and mineral composition in some selected fresh water fishes in Nigeria. Internet Journal of Food Safety, 9, 52-55., 9, 52–55.

Fay, R. (2009). Soundscapes and the sense of hearing of fishes. Integrative Zoology, 4(1), 26–32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2008.00132.x>

Fernández-Cabanás., V. M., Pérez-Urrestarazu, L., Juárez, A., Kaufman, N. T., & Gross, J. A. (2020). Comparative Analysis of Horizontal and Vertical Decoupled Aquaponic Systems for Basil Production and Effect of Light Supplementation by LED. Agronomy. Vol. 10: 1414, 10, 1414.

- Ferreira Da Costa, O. T., Dos Santos Ferreira, D. J., Presti Mendonça, F. L., & Fernandes, M. N. (2004). Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, 232(1–4), 627–636. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00524-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00524-6)
- FIZ, Fischinformationszentrum e.V. (2021). *Fischwirtschaft Daten und Fakten 2021*.
- FIZ, Fisch-Informationszentrum e. V. (2024). *Fischwirtschaft – Daten und Fakten 2024*.
- Focardi, S., Corsi, I., & Franchi, E. (2005). Safety issues and sustainable development of European aquaculture: New tools for environmentally sound aquaculture. *Aquaculture International*, 13(1–2), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s10499-004-9036-0>
- Folke, C., & Kautsky, N. (1992). Aquaculture with its environment: Prospects for sustainability. *Ocean & Coastal Management*, 17(1), 5–24. [https://doi.org/10.1016/0964-5691\(92\)90059-T](https://doi.org/10.1016/0964-5691(92)90059-T)
- Freire, C. A., & Sampaio, F. D. F. (2021). Stress and disease in aquaculture, and their effects on homeostasis and osmoregulation: The metabolic connection. In *Aquaculture Pharmacology* (S. 273–295). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821339-1.00010-6>
- Froese, R., & Pauly, D. (2024). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org. (10/2024)
- Gabriel, U. U., Ezeri, G. N. O., & Opabunmi, O. O. (2004). Influence of sex, source, health status and acclimation on the haematology of *Clarias gariepinus* (Burch,1822). *African Journal of Biotechnology*, 3(9), 463–467. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2090>
- Gall, G. A. E., & Bakar, Y. (1999). Stocking density and tank size in the design of breed improvement programs for body size of tilapia. *Aquaculture*, 173(1–4), 197–205. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00487-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00487-6)
- Gambrell, R. P. (1994). Trace and Toxic Metals in Wetlands-A Review. *Journal of Environmental Quality*, 23(5), 883–891. <https://doi.org/10.2134/jeq1994.00472425002300050005x>
- Gao, Y., Wang, X., Li, J., Lee, C. T., Ong, P. Y., Zhang, Z., & Li, C. (2020). Effect of aquaculture salinity on nitrification and microbial community in moving bed bioreactors with immobilized microbial granules. *Bioresource Technology*, 297, 122427. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122427>
- Gatto, E., Santacà, M., Verza, I., Dadda, M., & Bisazza, A. (2021). Automated Operant Conditioning Devices for Fish. Do They Work? *Animals*, 11(5), 1397. <https://doi.org/10.3390/ani11051397>
- Giri, S. S. & SAARC Agriculture Centre (Hrsg.). (2018). Policy farming for control of transboundary aquatic animal diseases. SAC/NR&DCA Regional Expert Consultation „Policy Framing on Transboundary Fish Diseases and their Control Measures in South Asia“, Dhaka. SAARC Agriculture Centre (SAC).
- Goddard, S. (1995). *Feed management in intensive aquaculture*. Springer Science & Business Media. ISBN: 0-412-07081-2
- Goddek, S., Delaide, B., Mankasingh, U., Ragnarsdottir, K., Jijakli, H., & Thorarinsdottir, R. (2015). Challenges of Sustainable and Commercial Aquaponics. *Sustainability*, 7(4), 4199–4224. <https://doi.org/10.3390/su7044199>
- Goddek, S., Delaide, B. P. L., Joyce, A., Wuertz, S., Jijakli, M. H., Gross, A., Eding, E. H., Bläser, I., Reuter, M., Keizer, L. C. P., Morgenstern, R., Körner, O., Verreth, J., & Keesman, K. J. (2018). Nutrient mineralization and organic matter reduction performance of RAS-based sludge in sequential UASB-EGSB reactors. *Aquacultural Engineering*, 83, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.07.003>

- Goddek, S., Espinal, C., Delaide, B., Jijakli, M., Schmautz, Z., Wuertz, S., & Keesman, K. (2016). Navigating towards Decoupled Aquaponic Systems: A System Dynamics Design Approach. *Water*, 8(7), 303. <https://doi.org/10.3390/w8070303>
- Gonçalves, A. A., & Gagnon, G. A. (2011). Ozone Application in Recirculating Aquaculture System: An Overview. *Ozone: Science & Engineering*, 33(5), 345–367. <https://doi.org/10.1080/01919512.2011.604595>
- Gonzalez, C., & Allan, G. (2007). Preparing Farm-made Fish Feed. NSW Department of Primary Industries. NSW Department of Primary Industries. ISBN 978 0 7347 1802 0. www.dpi.nsw.gov.au
- Graaf, G. D., & Janssen, J. (1996). Handbook on the artificial reproduction and pond rearing of the African catfish *Clarias gariepinus* in sub-Saharan Africa.: Bd. FAO, Fisheries technical paper 362 Rome, 1996.
- Grzywacz, A., Gdula-Argasińska, J., Muszyńska, B., Tyszka-Czochara, M., Librowski, T., & Opoka, W. (2015). Metal responsive transcription factor 1 (MTF-1) regulates zinc dependent cellular processes at the molecular level. *Acta Biochimica Polonica*, 62(3), 491-498.
- Günther, V., Lindert, U., & Schaffner, W. (2012). The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1416–1425. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.005>
- Halachmi, I. (2007). Biomass management in recirculating aquaculture systems using queuing networks. *Aquaculture*, 262(2–4), 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.015>
- Halwart, M. and M.V. Gupta (eds.) 2004. Culture of fish in rice fields. FAO and The WorldFish Center, 83 p
- Hang, S., Zhao, J., Ji, B., Li, H., Zhang, Y., Peng, Z., Zhou, F., Ding, X., & Ye, Z. (2021). Impact of underwater noise on the growth, physiology and behavior of *Micropterus salmoides* in industrial recirculating aquaculture systems. *Environmental Pollution*, 291, 118152. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118152>
- Hanika, S., & Kramer, B. (1999). Electric Organ Discharges of Mormyrid Fish as a Possible Cue for Predatory Catfish. *Naturwissenschaften*, 86(6), 286–288. <https://doi.org/10.1007/s001140050616>
- Hanika, S., & Kramer, B. (2000). Electrosensory prey detection in the African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Clariidae), of a weakly electric mormyrid fish, the bulldog (*Marcusenius macrolepidotus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 48(3), 218–228. <https://doi.org/10.1007/s002650000232>
- Harvell, C. D., Kim, K., Burkholder, J. M., Colwell, R. R., Epstein, P. R., Grimes, D. J., Hofmann, E. E., Lipp, E. K., Osterhaus, A. D. M. E., Overstreet, R. M., Porter, J. W., Smith, G. W., & Vasta, G. R. (1999). Emerging Marine Diseases—Climate Links and Anthropogenic Factors. *Science*, 285(5433), 1505–1510. <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1505>
- Haylor, G. S. (1991). Controlled hatchery production of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822): Growth and survival of fry at high stocking density. *Aquaculture Research*, 22(4), 405–422. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1991.tb00754.x>
- Hecht, T., & Appelbaum, S. (1987). Notes on the growth of Israeli sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) during the primary nursing phase. *Aquaculture*, 63(1–4), 195–204. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90071-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90071-8)

- Hecht, T., & Appelbaum, S. (1988). Observations on intraspecific aggression and coeval sibling cannibalism by larval and juvenile *Clarias gariepinus* (Clariidae: Pisces) under controlled conditions. *Journal of Zoology*, 214(1), 21–44. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1988.tb04984.x>
- Hecht, T., & Pienaar, A. G. (1993). A Review of Cannibalism and its Implications in Fish Larviculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(2), 246–261. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00014.x>
- Hematyar, N., Imentai, A., Křišťan, J., Gorakh Waghmare, S., & Policar, T. (2022). Considering Two Aspects of Fish Welfare on African Catfish (*Clarias gariepinus*) Fillet throughout Postmortem Condition: Efficiency and Mechanisms. *Foods*, 11(24), 4090. <https://doi.org/10.3390/foods11244090>
- Hengsawat, K., Ward, F. J., & Jaruratjamorn, P. (1997). The effect of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) cultured in cages. *Aquaculture*, 152(1–4), 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00008-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00008-2)
- Hewitt, E. J. (1952). Composition and preparation of nutrient solution. In: *Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition*. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux. pp. 187–191., 187–191.
- Heydarnejad, M. S. (2012). Survival and growth of common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to different water pH levels. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. <https://doi.org/10.3906/vet-1008-430>
- Hider, R. C., Silva, A. M. N., & Cilibrizzi, A. (2024). The iron(III) coordinating properties of citrate and α -hydroxycarboxylate containing siderophores. *BioMetals*. <https://doi.org/10.1007/s10534-024-00607-z>
- Hildebrand, M.-C., Hentrich, N., & Palm, H. W. (2024a). The role of light in the rearing of *Clarias gariepinus* larvae: Effects on behaviour, growth and survival. *Aquaculture Reports*, 39, 102420. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102420>
- Hildebrand, M.-C., Rebl, A., Goldammer, T., Palm, H. W., & Baßmann, B. (2024b). Effects of Zn-EDTA on the health and welfare of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), in a recirculating aquaculture system. *Frontiers in Aquaculture*, 3, 1383534. <https://doi.org/10.3389/faquc.2024.1383534>
- Hildebrand, M.-C., Rebl, A., Nguinkal, J. A., Palm, H. W., & Baßmann, B. (2023). Effects of Fe-DTPA on Health and Welfare of the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Water*, 15(2), 299. <https://doi.org/10.3390/w15020299>
- Hildebrand, M.-C., Runge, D., Bassmann, B., & Palm, H. W. (2025). The Influence of Different Feeding Time Management on the Growth and Stress Response of the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Under Farming Conditions. *Fishes*, 10(8), 414. <https://doi.org/10.3390/fishes10080414>
- Hine, M., Adams, S., Arthur, J. R., Bartley, D., Bondad-Reantaso, M. G., Chávez, C., Clausen, J. H., Dalsgaard, A., Flegel, T., Gudding, R., Hallerman, E., Hewitt, C., Karunasagar, I., Madsen, H., & Mohan, C. V. (2010). Improving biosecurity: A necessity for aquaculture sustainability. In *Farming the Waters for People and Food. Proceedings of the Global Conference on Aquaculture 2010*. FAO, Rome and NACA, Bangkok.
- Hoffmann, R. C. (1994). Remains and verbal evidence of carp (*Cyprinus carpio*) in medieval Europe.
- Hoffmann, R. C. (2005). A brief history of aquatic resource use in medieval Europe. *Helgoland Marine Research*, 59(1), 22–30. <https://doi.org/10.1007/s10152-004-0203-5>

- Hogstrand, C., Balesaria, S., & Glover, C. N. (2002). Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish species, the rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 133(4), 523–535. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00125-2)
- Hossain, M. A. R., Batty, R. S., Haylor, G. S., & Beveridge, M. C. M. (1999). Diel rhythms of feeding activity in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822): Diel rhythm in catfish M A R Hossain et al. *Aquaculture Research*, 30(11–12), 901–905. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00421.x>
- Hossain, M. A., & Yoshimatsu, T. (2014). Dietary calcium requirement in fishes. *Aquaculture Nutrition*, 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/anu.12135>
- Huang, F., Jiang, M., Wen, H., Wu, F., Liu, W., Tian, J., & Yang, C. (2015). Dietary zinc requirement of adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed semi-purified diets, and effects on tissue mineral composition and antioxidant responses. *Aquaculture*, 439, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.018>
- Huang, W.-B., & Chiu, T.-S. (1997). Effects of stocking density on survival, growth, size variation, and production of Tilapia fry. *Aquaculture Research*, 28(3), 165–173. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1997.t01-1-00843.x>
- Hubold, G., & Klepper, R. (2013). Die Bedeutung von Fischerei und Aquakultur für die globale Ernährungssicherung. J. H. von Thünen-Institut. https://doi.org/10.3220/WP_3_2013
- Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandøe, P., & Turnbull, J. F. (2006). Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*, 68(2), 332–372. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.001046.x>
- Ohimain, E. (2014). Toxicological Assessment of Groundwater Containing High Levels of Iron against Fresh Water Fish (*Clarias Gariepinus*). *American Journal of Environmental Protection*, 3(2), 59. <https://doi.org/10.11648/j.ajep.20140302.13>
- InnoAquaTech. (2023). Decision Support Tool [Software]. InnoAquaTech. <http://aquaculture.teknologisk.dk>
- Ip, Y. K., Chew, S. F., Wilson, J. M., & Randall, D. J. (2004). Defences against ammonia toxicity in tropical air-breathing fishes exposed to high concentrations of environmental ammonia: A review. *Journal of Comparative Physiology B*. <https://doi.org/10.1007/s00360-004-0445-1>
- Ip, Y. K., Lau, I. Y., Wong, W. P., Lee, S. L. M., & Chew, S. F. (2005). The African Sharptooth Catfish *Clarias gariepinus* Can Tolerate High Levels of Ammonia in Its Tissues and Organs during Four Days of Aerial Exposure. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(4), 630–640. <https://doi.org/10.1086/430691>
- Islam, M. S., Rahman, M. M., & Tanaka, M. (2006). Stocking density positively influences the yield and farm profitability in cage aquaculture of sutchi catfish, *Pangasius sutchi*. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(5), 441–445. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00746.x>
- Janiak, C., Meyer, H.-J., Gudat, D., & Schulzke, C. (2023). Riedel Moderne Anorganische Chemie (E. Riedel & H.-J. Meyer, Hrsg.). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110790221>
- Jaynes, D. B., & Rogowski, A. S. (1983). Applicability of Fick's Law to Gas Diffusion. *Soil Science Society of America Journal*, 47(3), 425–430. <https://doi.org/10.2136/sssaj1983.03615995004700030007x>
- Jeong, J., & Eide, D. J. (2013). The SLC39 family of zinc transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 612–619. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.011>

- Jerlov, N. G. (1968). Optical Oceanography. Elsevier publishing company. Catalog card number 68-12475
- Jobling, M. (2016). Fish nutrition research: Past, present and future. *Aquaculture International*, 24(3), 767–786. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9875-2>
- Johnson, R., Wolf, J., & Braunbeck, T. (2009). OECD Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads. Organization for Economic Co-operation and Development, 96, 1-96.
- Joyce, A., Timmons, M., Goddek, S., & Pentz, T. (2019). Bacterial relationships in aquaponics: New research directions. In *Aquaponics Food Production Systems*. S. 145–161. Springer.
- Junge, R., & Graber, A. (2014). The potential of aquaponics for food production in the cities of the future. University of Ljubljana.
- Kaiser, H., Weyl, O., & Hecht, T. (1995). The effect of stocking density on growth, survival and agonistic behaviour of African catfish. *Aquaculture International*, 3(3), 217–225. <https://doi.org/10.1007/BF00118103>
- Karayakar, F., Seçen, F., & Cıçık, B. (2021). The effects of EDTA on zinc accumulation in tissues of *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758). *Natural and Engineering Sciences*, 6(1), 30-38.
- Kasozi, N., Tandlich, R., Fick, M., Kaiser, H., & Wilhelmi, B. (2019). Iron supplementation and management in aquaponic systems: A review. *Aquaculture Reports*, 15, 100221. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100221>
- Kathirvel, P., & Richards, M. P. (2012). Effect of a membrane permeable metal chelator on iron and hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed fish muscle. *Food Research International*, 48(2), 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.016>
- Kawamura, G., Bagarinao, T., Hoo, P. K., Justin, J., & Lim, L. S. (2017). Colour discrimination in dim light by the larvae of the African catfish *Clarias gariepinus*. *Ichthyological Research*, 64(2), 204–211. <https://doi.org/10.1007/s10228-016-0557-0>
- Kawamura, G., Bagarinao, T. U., Asmad, M. F. B., & Lim, L.-S. (2017). Food colour preference of hatchery-reared juveniles of African catfish *Clarias gariepinus*. *Applied Animal Behaviour Science*, 196, 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.06.013>
- Kaya, D., Genc, E., Genc, M. A., Aktas, M., Eroldogan, O. T., & Guroy, D. (2020). Biofloc technology in recirculating aquaculture system as a culture model for green tiger shrimp, *Penaeus semisulcatus*: Effects of different feeding rates and stocking densities. *Aquaculture*, 528, 735526. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735526>
- Khanjani, M. H., & Sharifinia, M. (2020). Biofloc technology as a promising tool to improve aquaculture production. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1836–1850. <https://doi.org/10.1111/raq.12412>
- Kiyani, V., Hosynzadeh, M., & Ebrahimpour, M. (2013). Investigation acute toxicity some of heavy metals at different water hardness. *International Journal of Advanced Biological and Biochemical Research*, 1, 134-142., 1, 134–142.
- Klein, V. (2016). Ursachenforschung: Wann werden Fische krank? In *Fischkrankheiten* (Bd. 101, S. 27–33).

- Knaus, U., & Palm, H. W. (2017a). Effects of fish biology on ebb and flow aquaponical cultured herbs in northern Germany (Mecklenburg Western Pomerania). *Aquaculture*, 466, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.025>
- Knaus, U., & Palm, H. W. (2017b). Effects of the fish species choice on vegetables in aquaponics under spring-summer conditions in northern Germany (Mecklenburg Western Pomerania). *Aquaculture*, 473, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.020>
- Knaus, U., Wenzel, L. C., Appelbaum, S., & Palm, H. W. (2020). Aquaponics (s.l.) Production of Spearmint (*Mentha spicata*) with African Catfish (*Clarias gariepinus*) in Northern Germany. *Sustainability*, 12(20), 8717. <https://doi.org/10.3390/su12208717>
- Kolarevic, J. (2020). The Nofima notebook. Ensuring the right light for RAS production. The Fish Site Limited, 7/8 Liberty St, Cork, T12 T85H, Ireland; CRO 707192. <https://thefishsite.com/articles/ensuring-the-right-light-for-ras-production>
- Konstantinidis, E., Perdikaris, C., & Ganiyas, K. (2021). Life cycle assessment during packaging of market-sized seabass and meagre: Necessary adaptations toward GHG neutrality. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 26(7), 1456–1470. <https://doi.org/10.1007/s11367-021-01943-9>
- Kotze, P., Du Preez, H. H., & Van Vuren, J. H. J. (1999). Bioaccumulation of copper and zinc in *Oreochromis mossambicus* and *Clarias gariepinus*, from the Olifants River, Mpumalanga, South Africa. *WATER SA-PRETORIA*, 25, 99–110., 25, 99–110.
- Kotzen, B., & Appelbaum, S. (2010). An Investigation of Aquaponics Using Brackish Water Resources in the Negev Desert. *Journal of Applied Aquaculture*, 22(4), 297–320. <https://doi.org/10.1080/10454438.2010.527571>
- Kroupova, H., Machova, J., & Svobodova, Z. (2005). Nitrite influence on fish: A review. *Veterinární medicína*, 50(11), 461–471. <https://doi.org/10.17221/5650-VETMED>
- Kumar, V., Roy, S., & Barman, D. (2013). Importance Of Health Management in Aquaculture. Central Institute of Fisheries Education, Mumbai, India. p.1-9
- Kunc, H. P., & Schmidt, R. (2019). The effects of anthropogenic noise on animals: A meta-analysis. *Biology Letters*, 15(11), 20190649. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0649>
- Kusku, H., Ergun, S., Yilmaz, S., Guroy, B., & Yigit, M. (2019). Impacts of urban noise and musical stimuli on growth performance and feed utilization of koi fish (*Cyprinus carpio*) in recirculating water conditions. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(6). https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_6_07
- Kusmic, C., & Gualtieri, P. (2000). Morphology and spectral sensitivities of retinal and extraretinal photoreceptors in freshwater teleosts. *Micron*, 31(2), 183–200. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00081-5](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00081-5)
- Lall, S. P., & Kaushik, S. J. (2021). Nutrition and Metabolism of Minerals in Fish. *Animals*, 11(9), 2711. <https://doi.org/10.3390/ani11092711>
- Lechner, W., Heiss, E., Schwaha, T., Glösmann, M., & Ladich, F. (2011). Ontogenetic Development of Weberian Ossicles and Hearing Abilities in the African Bullhead Catfish. *PLoS ONE*, 6(4), e18511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018511>

- Lechner, W., & Ladich, F. (2008). Size matters: Diversity in swimbladders and Weberian ossicles affects hearing in catfishes. *Journal of Experimental Biology*, 211(10), 1681–1689. <https://doi.org/10.1242/jeb.016436>
- Lee, C. K., Kawamura, G., Senoo, S., Ching, F. F., & Luin, M. (2014). Colour vision in juvenile African catfish *Clarias gariepinus*. *International Research Journal of Biological Sciences*, 3(1), 36–41.
- Lee, J. S. F., Britt, L. L., Cook, M. A., Wade, T. H., Berejikian, B. A., & Goetz, F. W. (2017). Effect of light intensity and feed density on feeding behaviour, growth and survival of larval sablefish *Anoplopoma fimbria*. *Aquaculture Research*, 48(8), 4438–4448. <https://doi.org/10.1111/are.13269>
- Lee, P. G., Lea, R. N., Dohmann, E., Prebilsky, W., Turk, P. E., Ying, H., & Whitson, J. L. (2000). Denitrification in aquaculture systems: An example of a fuzzy logic control problem. *Aquacultural Engineering*, 23(1–3), 37–59. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00046-7)
- Lee, Z. P., Carder, K. L., Steward, R. G., Peacock, T. G., Davis, C. O., & Patch, J. S. (1998). An empirical algorithm for light absorption by ocean water based on color. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 103(C12), 27967–27978. <https://doi.org/10.1029/98JC01946>
- Lefevre, S., Wang, T., Jensen, A., Cong, N. V., Huong, D. T. T., Phuong, N. T., & Bayley, M. (2014). Air-breathing fishes in aquaculture. What can we learn from physiology? *Journal of Fish Biology*, 84(3), 705–731. <https://doi.org/10.1111/jfb.12302>
- Lennard, W. A. (2015). Aquaponics: A nutrient dynamic process and the relationship to fish feeds. *World Aquaculture*, 2015, Vol. 46, No. 3, 20–23 ref. 5, 46, 20–23.
- Levin, L. E., & Levin, A. F. (1994). Conditioning as an aid to fish harvest. *Aquacultural Engineering*, 13(3), 201–210. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(94\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0144-8609(94)90003-5)
- Li, L., Shen, Y., Yang, W., Xu, X., & Li, J. (2021). Effect of different stocking densities on fish growth performance: A meta-analysis. *Aquaculture*, 544, 737152. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737152>
- Lindholm-Lehto, P. (2023). Water quality monitoring in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture, Fish and Fisheries*, 3(2), 113–131. <https://doi.org/10.1002/aff2.102>
- Lindholm-Lehto, P. C., Lindroos, A.-J., Pulkkinen, J. T., Kiuru, T., & Vielma, J. (2022). Trace elements, anions, and carbohydrates in the recirculating aquaculture system using woodchip denitrification, constructed wetland, and sand infiltration. *Water Quality Research Journal*, 57(2), 59–71. <https://doi.org/10.2166/wqrj.2022.030>
- Longo, S. B., Clark, B., & York, R. (2013). The globalization of ecologically intensive aquaculture (1984–2008). *Journal of Environmental Studies and Sciences*, 3(3), 297–305. <https://doi.org/10.1007/s13412-013-0124-1>
- Lopes, P., Pinheiro, T., Santos, M., Daluzmathias, M., Collarespereira, M., & Viegascrespo, A. (2001). Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *The Science of The Total Environment*, 280(1–3), 153–163. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00822-1](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00822-1)
- López-Olmeda, J. F., Noble, C., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2012). Does feeding time affect fish welfare? *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 143–152. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9523-y>

- Losordo, T. M., & Hobbs, A. O. (2000). Using computer spreadsheets for water flow and biofilter sizing in recirculating aquaculture production systems. *Aquacultural Engineering*, 23(1–3), 95–102. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00048-0)
- Rakocy, J. E., Losordo, T. M. & Masser, M. P. (2000). Recirculating aquaculture tank production systems (453. Aufl.). SRAC Publication.
- Love, D. C., Fry, J. P., Genello, L., Hill, E. S., Frederick, J. A., Li, X., & Semmens, K. (2014). An International Survey of Aquaponics Practitioners. *PLoS ONE*, 9(7), e102662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102662>
- Love, D. C., Uhl, M. S., & Genello, L. (2015a). Energy and water use of a small-scale raft aquaponics system in Baltimore, Maryland, United States. *Aquacultural Engineering*, 68, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2015.07.003>
- Love, D. C., Fry, J. P., Li, X., Hill, E. S., Genello, L., Semmens, K., & Thompson, R. E. (2015b). Commercial aquaponics production and profitability: Findings from an international survey. *Aquaculture*, 435, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.023>
- Macaulay, G., Bui, S., Oppedal, F., & Dempster, T. (2021). Challenges and benefits of applying fish behaviour to improve production and welfare in industrial aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), 934–948. <https://doi.org/10.1111/raq.12505>
- MacIntyre, C. M., Ellis, T., North, B. P., & Turnbull, J. F. (2008). The influences of water quality on the welfare of farmed rainbow trout: A review. In *Fish welfare*. S. 150–184. Blackwell Publishing Ltd.
- Mallatt, J. (1985). Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants: A Statistical Review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4), 630–648. <https://doi.org/10.1139/f85-083>
- Mallya, Y. J. (2007). The effects of dissolved oxygen on fish growth in aquaculture. The United Nations University Fisheries Training Programme, Final Project.
- Manahan, S. E. (2022). *Environmental Chemistry* (11. Aufl.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003096238>
- Manns, R. (2012). Leitfähigkeitsmessung, Konzentration, TDS. JUMO GmbH. FAS 614
- Manuel, R., Boerrigter, J. G. J., Cloosterman, M., Gorissen, M., Flik, G., Van Den Bos, R., & Van De Vis, H. (2016). Effects of acute stress on aggression and the cortisol response in the African sharptooth catfish *Clarias gariepinus*: Differences between day and night. *Journal of Fish Biology*, 88(6), 2175–2187. <https://doi.org/10.1111/jfb.12989>
- Martan, E. (2008). Polyculture of fishes in aquaponics and recirculating aquaculture. *Aquaponics Journal*, 48(1), 28–33.
- Martins, C. I. M., Eding, E. H., Verdegem, M. C. J., Heinsbroek, L. T. N., Schneider, O., Blancheton, J. P., d'Orbcastel, E. R., & Verreth, J. A. J. (2010). New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*, 43(3), 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2010.09.002>
- Martins, C. I. M., Eding, E. H., & Verreth, J. A. J. (2011). The effect of recirculating aquaculture systems on the concentrations of heavy metals in culture water and tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Food Chemistry*, 126(3), 1001–1005. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.108>

Masser, M. P., Rakocy, J., & Losordo, T. M. (2000). Recirculating aquaculture tank production systems (452. Aufl.). SRAC Publication. Vol. 452

Maucieri, C., Nicoletto, C., Zanin, G., Xiccato, G., Borin, M., & Sambo, P. (2020). Composition and quality traits of vegetables grown in a low-tech aquaponic system at different fish stocking densities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(11), 4310–4318. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10475>

McGeer, J. C., Szebedinszky, C., McDonald, D. G., & Wood, C. M. (2000). Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, 50(3), 231–243. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00105-8)

Meriç, İ. (2017). Mineral element and nutrient composition of two newly introduced fish species (*Dentex dentex* and *Seriola dumerili*) in recirculating aquaculture systems (RAS). *Gida / The Journal of Food*, 42, 163–168. <https://doi.org/10.15237/gida.GD16089>

Meyer, F. P. (1991). Aquaculture disease and health management. *Journal of Animal Science*, 69(10), 4201–4208. <https://doi.org/10.2527/1991.69104201x>

Mickle, M. F., & Higgs, D. M. (2018). Integrating techniques: A review of the effects of anthropogenic noise on freshwater fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 75(9), 1534–1541. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2017-0245>

Midilli, A., Kucuk, H., & Dincer, I. (2012). Environmental and sustainability aspects of a recirculating aquaculture system. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 31(4), 604–611. <https://doi.org/10.1002/ep.10580>

Mills, S. C., Beldade, R., Henry, L., Laverty, D., Nedelec, S. L., Simpson, S. D., & Radford, A. N. (2020). Hormonal and behavioural effects of motorboat noise on wild coral reef fish. *Environmental Pollution*, 262, 114250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114250>

Mitteilung der Kommission (COM) an das Europäische Parlament, Den Rat, Den Europäischen Wirtschafts- und Sozialausschuss und den Ausschuss der Regionen vom 12.5.2021 über strategische Leitlinien für eine nachhaltigere und wettbewerbsfähigere Aquakultur in der EU für den Zeitraum 2021 bis 2030,. COM(2021) 236 final.

Molokwu, C. N., & Okpokwasili, G. C. (2002). Effect of water hardness on egg hatchability and larval viability of *Clarias gariepinus*. *Aquaculture International*, 10(1), 57–64. <https://doi.org/10.1023/A:1021395122919>

Momoh, P., & Solomon, R. J. (2017). Physiochemical parameters of Catfish (*Clarias gariepinus*) fed a combination of rice bran and Irish potatoes. *Direct Research Journal of Veterinary Medicine and Animal Science*, 2(2), 36-50., 2, 36–50.

Monsees, H., Keitel, J., Paul, M., Kloas, W., & Wuertz, S. (2017). Potential of aquacultural sludge treatment for aquaponics: Evaluation of nutrient mobilization under aerobic and anaerobic conditions. *Aquaculture Environment Interactions*, 9, 9–18. <https://doi.org/10.3354/aei00205>

Montero, D., Izquierdo, M. S., Tort, L., Robaina, L., & Vergara, J. M. (1999). Fish Physiology and Biochemistry, 20(1), 53–60. <https://doi.org/10.1023/A:1007719928905>

Moreno-Andrés, J., Rueda-Márquez, J. J., Homola, T., Vielma, J., Moríñigo, M. Á., Mikola, A., Sillanpää, M., Acevedo-Merino, A., Nebot, E., & Levchuk, I. (2020). A comparison of photolytic, photochemical and photocatalytic processes for disinfection of recirculation aquaculture systems (RAS) streams. *Water Research*, 181, 115928. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115928>

- MRCCC, Mary River Catchment Coordinating Committee. (2013). Water quality standards (2013). <http://mrccc.org.au/wp-content/uploads/2013/10/Water-Quality-Salinity-Standards.pdf>,
- Mugwanya, M., Dawood, M. A. O., Kimera, F., & Sewilam, H. (2022). A review on recirculating aquaculture system: Influence of stocking density on fish and crustacean behavior, growth performance, and immunity. *Annals of Animal Science*, 22(3), 873–884. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0014>
- Mukai, Y., & Lim, L. S. (2014). Visual thresholds for feeding and optimum light intensity for larval rearing of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture Research*, 45(2), 188–194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03213.x>
- Munang'andu, H. M. (2016). Environmental Viral Metagenomics Analyses in Aquaculture: Applications in Epidemiology and Disease Control. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01986>
- Murray, K. R. (1993). Editorial comment on light intensity measurements. *Aquacult. Eng*, 13, 242–243., 13, 242–243.
- Mustapha, M. K., Oladokun, O. T., Salman, M. M., Adeniyi, I. A., & Ojo, D. (2014). Does light duration (photoperiod) have an effect on the mortality and welfare of cultured *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*? *Turkish journal of zoology*, 38, 466–470. <https://doi.org/10.3906/zoo-1309-23>
- Mustapha, M., Okafor, B., Olaoti, K., & Oyelakin, O. (2012). Effects of three different photoperiods on the growth and body coloration of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Archives of Polish Fisheries*, 20(1). <https://doi.org/10.2478/v10086-012-0007-1>
- Naddy, R. B., Stubblefield, W. A., May, J. R., Tucker, S. A., & Hockett, J. R. (2002). The effect of calcium and magnesium ratios on the toxicity of copper to five aquatic species in freshwater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(2), 347–352. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210217>
- Naegel, L. C. A. (1977). Combined production of fish and plants in recirculating water. *Aquaculture*, 10(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(77\)90029-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(77)90029-1)
- Nash, C. E. (2011). *The History of Aquaculture* (1. Aufl.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470958971>
- Naylor, R., Fang, S., & Fanzo, J. (2023). A global view of aquaculture policy. *Food Policy*, 116, 102422. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2023.102422>
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., Forster, I., Gatlin, D. M., Goldburg, R. J., Hua, K., & Nichols, P. D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15103–15110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905235106>
- Ndubuisi, U. C., Chimezie, A. J., Chinedu, U. C., Chikwem, I. C., & Alexander, U. (2015). Effect of pH on the growth performance and survival rate of *Clarias gariepinus* fry. *International Journal of Research in Biosciences*, 4(3), 14–20.
- Nedelec, S. L., Mills, S. C., Lecchini, D., Nedelec, B., Simpson, S. D., & Radford, A. N. (2016). Repeated exposure to noise increases tolerance in a coral reef fish. *Environmental Pollution*, 216, 428–436. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.058>
- Neo, Y. Y., Hubert, J., Bolle, L., Winter, H. V., Ten Cate, C., & Slabbekoorn, H. (2016). Sound exposure changes European seabass behaviour in a large outdoor floating pen: Effects of temporal structure and

a ramp-up procedure. *Environmental Pollution*, 214, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.075>

Ninwichian, P., Phuwan, N., & Limlek, P. (2022). Effects of tank color on the growth, survival rate, stress response, and skin color of juvenile hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 554, 738129. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738129>

Nozzi, V., Graber, A., Schmutz, Z., Mathis, A., & Junge, R. (2018). Nutrient Management in Aquaponics: Comparison of Three Approaches for Cultivating Lettuce, Mint and Mushroom Herb. *Agronomy*, 8(3), 27. <https://doi.org/10.3390/agronomy8030027>

Nugegoda, D., & Rainbow, P. S. (1988). Effect of a chelating agent (EDTA) on zinc uptake and regulation by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 68(1), 25–40. <https://doi.org/10.1017/S0025315400050074>

Nummela, S., & Thewissen, J. G. M. H. (Hrsg.). (2019). 11 The Physics of Sound in Air and Water. In *Sensory Evolution on the Threshold*. S. 175–182. University of California Press. <https://doi.org/10.1525/9780520934122-012>

Nwosu, B. F. M., & Holzlohner, S. (2000). Effect of light periodicity and intensity on the growth and survival of *Heterobranchus longifilis* Val. 1840 (Teleostei: Clariidae) larvae after 14 days of rearing. *Journal of Applied Ichthyology*, 16(1), 24–26. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2000.00145.x>

Oidtman, B., Johnston, C., Klotins, K., Mylrea, G., Van, P. T., Cabot, S., Martin, P. R., Ababouch, L., & Berthe, F. (2013). Assessment of the Safety of Aquatic Animal Commodities for International Trade: The OIE Aquatic Animal Health Code. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(1), 27–38. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01315.x>

Ojonugwa, E. B., & Solomon, R. J. (2017). Effects of over stocking on the growth rate of *Clarias gariepinus*. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2(3), 84–95., 2, 84–95.

Oké, V., & Goosen, N. J. (2019). The effect of stocking density on profitability of African catfish (*Clarias gariepinus*) culture in extensive pond systems. *Aquaculture*, 507, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.043>

Olagunju, O. F., Kristófersson, D., Tómasson, T., & Kristjánsson, T. (2022). Profitability assessment of catfish farming in the Federal Capital Territory of Nigeria. *Aquaculture*, 555, 738192. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738192>

Olawusi-Peters, O. O., Ayo-Olalus, C. I., & Adeyemi, T. V. (2014). Bioaccumulation of some trace element (Zn, Fe, Pb and Cu) in the gills and tissues of *Clarias gariepinus* and *Oreochromis niloticus* in River Ogbese, Ondo State, Nigeria. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 6(2), 13–19. <https://doi.org/10.5897/JECE2013.0308>

Oliva-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, 35(2), 83–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>

Ololade, I. A., & Ogini, O. (2009). Behavioural and hematological effects of zinc on African catfish, *Clarias gariepinus*. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 1(2), 22–27., 1, 22–27.

Omofunmi, O. E. (2017). The preliminary study on the suitability of African catfish effluent as an irrigation water source in South West Nigeria. *Journal of Agricultural Science and Environment*, 16(2), 107–119. <https://doi.org/10.51406/jagse.v16i2.1712>

- Onwuteaka, J., & Prince, C. O. (2015). Cannibalism of juvenile catfish (*Clarias gariepinus* Burchell). J. Environmental Sci. Toxicol. Food Technol, 9, 46–49., 9, 46–49. <https://doi.org/10.9790/2402-09214649>
- Oppedal, F., Vågseth, T., Dempster, T., Juell, J.-E., & Johansson, D. (2011). Fluctuating sea-cage environments modify the effects of stocking densities on production and welfare parameters of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 315(3–4), 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.037>
- Pai, M., Verma, A. K., Krishnani, K. K., Varghese, T., Hittinahalli, C. M., & Verma, M. K. (2024). Stocking density optimization and its impact on growth and physiological responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hybrid biofloc-RAS culture system. Aquaculture, 588, 740920. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740920>
- Palić, D., Scarfe, A. D., & Walster, C. I. (2015). A Standardized Approach for Meeting National and International Aquaculture Biosecurity Requirements for Preventing, Controlling, and Eradicating Infectious Diseases. Journal of Applied Aquaculture, 27(3), 185–219. <https://doi.org/10.1080/10454438.2015.1084164>
- Palm, H. W., & Bischoff, A. A. (2016). Aquakultur – quo vadis?!: Nachhaltige Fischzucht in modernen Produktionssystemen. Biologie in unserer Zeit, 46(2), 118–125. <https://doi.org/10.1002/biuz.201610591>
- Palm, H. W., Bissa, K., & Knaus, U. (2014). Significant factors affecting the economic sustainability of closed aquaponic systems. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation, 7(3), 162–175.
- Palm, H. W., Knaus, U., Appelbaum, S., Goddek, S., Strauch, S. M., Vermeulen, T., Haïssam Jijakli, M., & Kotzen, B. (2018a). Towards commercial aquaponics: A review of systems, designs, scales and nomenclature. Aquaculture International, 26(3), 813–842. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0249-z>
- Palm, H. W., Knaus, U., & Kotzen, B. (2024). Aquaponics nomenclature matters: It is about principles and technologies and not as much about coupling. Reviews in Aquaculture, 16(1), 473–490. <https://doi.org/10.1111/raq.12847>
- Palm, H. W., Knaus, U., Wasenitz, B., Bischoff, A. A., & Strauch, S. M. (2018). Proportional up scaling of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) commercial recirculating aquaculture systems disproportionally affects nutrient dynamics. Aquaculture, 491, 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.021>
- Păpuc, T., Petrescu-Mag, I. V., Gavriloiu, C., Botha, M., Kovacs, E., & Coroian, C. O. (2019). Swimming in the mud-a short review of environmental parameter ranges tolerated by *Clarias gariepinus*. Extreme Life, Biospeology & Astrobiology, 11(1), 11, 1.
- Paramanik, M., Ferozekhan, S., & Sahoo, S. K. (2014). Does the dark condition enhance growth and survival of *Clarias batrachus* larvae at higher stocking density? International Journal of Fisheries and Aquatic Studies 2014; 2(2): 142–144, 2, 142–144.
- Pasch, J. (2022). Rezirkulierende Aquakultursysteme (RAS) des Afrikanischen Raubwelses *Clarias gariepinus* und ihre Bedeutung für die landwirtschaftliche Entwicklung in Mecklenburg-Vorpommern. (Dissertation). University of Rostock.
- Pasch, J., & Palm, H. W. (2021). Economic Analysis and Improvement Opportunities of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Aquaculture in Northern Germany. Sustainability, 13(24), 13569. <https://doi.org/10.3390/su132413569>

- Pattillo, D.A. (2017). An overview of aquaponic systems: Hydroponic components. NRAC Tech. Bull. Ser., 19 (2017), pp. 1-10, 19, 1–10.
- Peng, Z.-H., & Zhang, L.-S. (2016). A review of research progress in air-to-water sound transmission. Chinese Physics B, 25(12), 124306. <https://doi.org/10.1088/1674-1056/25/12/124306>
- Péron, G., François Mittaine, J., & Le Gallic, B. (2010). Where do fishmeal and fish oil products come from? An analysis of the conversion ratios in the global fishmeal industry. Marine Policy, 34(4), 815–820. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2010.01.027>
- Piedrahita, R. H. (2003). Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. Aquaculture, 226(1–4), 35–44. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00465-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00465-4)
- Pillay, T. V. R. (1990). Aquaculture: Principles and practices. Fishing News Books. p. 575pp. Oxford. ISBN: 978-0-85238-168-7
- Pinho, S. M., David, L. H., Garcia, F., Keesman, K. J., Portella, M. C., & Goddek, S. (2021). South American fish species suitable for aquaponics: A review. Aquaculture International, 29(4), 1427–1449. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00674-w>
- Pintado, J., Del Olmo, G., Guinebert, T., Ruiz, P., Nappi, J., Thomas, T., Egan, S., Masaló, I., & Cremades, J. (2023). Manipulating the *Ulva* holobiont: Co-culturing *Ulva ohnoi* with *Phaeobacter* bacteria as a strategy for disease control in fish-macroalgae IMTA-RAS aquaculture. Journal of Applied Phycology, 35(5), 2017–2029. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-02986-1>
- Popa, R., Moga, I., Rissdorfer, M., Georgina ILIS, M. L., Petrescu, G., Craciun, N., Matache, M. G., Covaliu, C. I., & Stoian, G. (2017). Duckweed utilization for fresh water conservation (management) in recirculated aquaculture systems. International Journal of Conservation Science, 2017, Vol 8, Issue 4, p715.
- Popper, A. N., & Fay, R. R. (1999). The Auditory Periphery in Fishes. In R. R. Fay & A. N. Popper (Hrsg.), Comparative Hearing: Fish and Amphibians (Bd. 11, S. 43–100). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0533-3_3
- Popper, A. N., & Hastings, M. C. (2009). The effects of anthropogenic sources of sound on fishes. Journal of Fish Biology, 75(3), 455–489. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02319.x>
- Popper, A. N., & Lu, Z. (2000). Structure–function relationships in fish otolith organs. Fisheries Research, 46(1–3), 15–25. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(00\)00129-6](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(00)00129-6)
- Popper, A. N., Platt, C., & Saidel, W. M. (1982). Acoustic functions in the fish ear. Trends in Neurosciences, 5, 276–280., 5, 276–280.
- Pourkhabbaz, A., Ebrahimpour Kasmani, M., Kiyani, V., & Hasan Hosynzadeh, M. (2011). Effects of water hardness and Cu and Zn on LC50 in *Gambusia holbrooki*. Chemical Speciation & Bioavailability, 23(4), 224–228. <https://doi.org/10.3184/095422911X13201685540769>
- Powell, A., & Scolding, J. W. S. (2018). Direct application of ozone in aquaculture systems. Reviews in Aquaculture, 10(2), 424–438. <https://doi.org/10.1111/raq.12169>
- Prabhu, P. A. J., Schrama, J. W., & Kaushik, S. J. (2016). Mineral requirements of fish: A systematic review. Reviews in Aquaculture, 8(2), 172–219. <https://doi.org/10.1111/raq.12090>

- Prokešová, M., Stejskal, V., Matoušek, J., Kouřil, J., & Baras, E. (2017). Effect of light intensity on early ontogeny of African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquaculture Research*, 48(1), 347–355. <https://doi.org/10.1111/are.13116>
- Pruder, G. D. (2004). Biosecurity: Application in aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 32(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.05.002>
- Prüter, J., Strauch, S. M., Wenzel, L. C., Klysubun, W., Palm, H. W., & Leinweber, P. (2020). Organic Matter Composition and Phosphorus Speciation of Solid Waste from an African Catfish Recirculating Aquaculture System. *Agriculture*, 10(10), 466. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100466>
- Pullin, A. S., Báldi, A., Can, O. E., Dieterich, M., Kati, V., Livoreil, B., Lövei, G., Mihók, B., Nevin, O., Selva, N., & Sousa-Pinto, I. (2009). Conservation Focus on Europe: Major Conservation Policy Issues That Need to Be Informed by Conservation Science. *Conservation Biology*, 23(4), 818–824. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01283.x>
- Radermaker, F., Surlemont, C., Sanna, P., Chardon, M., & Vandewalle, P. (1989). Ontogeny of the Weberian apparatus of *Clarias gariepinus* (Pisces, Siluriformes). *Canadian Journal of Zoology*, 67(9), 2090–2097. <https://doi.org/10.1139/z89-298>
- Rahman, M. M. (2015). Role of common carp (*Cyprinus carpio*) in aquaculture production systems. *Frontiers in Life Science*, 8(4), 399–410. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1045629>
- Rahmatullah, R., Das, M., & Rahmatullah, S. M. (2010). Suitable stocking density of tilapia in an aquaponic system. *Bangladesh. Fish. Res.*, 14(1-2), 2010:29-35.
- Rakocy, J. E. (1989). Hydroponic lettuce production in a recirculating fish culture system. *Univ. Virgin Islands Agric. Exp. Station, Island Perspect* 3: 5–10.
- Rakocy, J. E., Masser, M. P., & Losordo, T. M. (2006). Recirculating aquaculture tank production systems: aquaponics integrating sh and plant culture. *SRAC Publication*, 454, 1-16.
- Rakocy, J. E., Shultz, R., & Thoman, E. (2010). Update on tilapia and vegetable production in the UVI aquaponic system. In *New dimensions on farmed Tilapia: proceedings of the sixth international symposium on Tilapia in Aquaculture*, held September (pp. 12-16).
- Rakocy, J. E. (2012). Aquaponics—Integrating fish and plant culture. In *Aquaculture production systems* (S. 344–386). Wiley.
- Rakocy, J. E., Masser, M. P., & Losordo, T. M. (2016). Recirculating aquaculture tank production systems: Aquaponics-integrating fish and plant culture. *Oklahoma Cooperative Extension Service*.
- Rama, S., & Manjabhat, S. N. (2014). Protective effect of shrimp carotenoids against ammonia stress in common carp, *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.016>
- Ramadan, A., Shalaby, A., El Gammal, M., El Aganif, E.-S. M. E. A., & Ebrahim, M. (2011). Beneficial using of EDTA to reduce cadmium toxicity and to improve the physiological and biochemical profiles of catfish (*Clarias gariepinus*). *Egyptian Journal for Aquaculture*, 1(1), 55–69. <https://doi.org/10.21608/eja.2011.32050>
- Rana, K. J., Siriwardena, S., & Hasan, M. R. (with Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2009). Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.

Reineke, W., & Schlömann, M. (2020). Kreisläufe von Schwefel, Eisen und Mangan. In W. Reineke & M. Schlömann, Umweltmikrobiologie (S. 321–343). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-59655-5_8

Remberger, M., & Svenson, A. (1997). The fate of EDTA and DTPA in aquatic environments receiving waste water from two pulp and paper mills. Swedish Environmental Research Inst., Stockholm (Sweden), 54 p.

Richtlinie (EWG) 91/67/EWG des Rates vom 28. Januar 1991 betreffend die tierseuchenrechtlichen Vorschriften für die Vermarktung von Tieren und anderen Erzeugnissen der Aquakultur,. ABl. L 46 vom 19.2.1991, S. 1–18. ELI: <http://data.europa.eu/eli/dir/1991/67/oj>

Richtlinie (EWG) 91/67/EWG des Rates vom 19.2.1991 betreffend die tierseuchenrechtlichen Vorschriften für die Vermarktung von Tieren und anderen Erzeugnissen der Aquakultur. (91/67/EWG), S. 16. ELI: <http://data.europa.eu/eli/dir/1991/67/2003-06-05>

Richtlinie (EWG) 93/53/EWG des Rates vom 24. Juni 1993 zur Festlegung von Mindestmaßnahmen der Gemeinschaft zur Bekämpfung bestimmter Fischseuchen. ABl. L 175 vom 19.7.1993, S. 23–33. ELI: <http://data.europa.eu/eli/dir/1993/53/oj>

Robins, C. R. (1991). World fishes important to North Americans. Exclusive of species from the continental waters of the United States and Canada. American Fisheries Society Special Publication, 21, 243., 21, 243.

Robinson, G., Caldwell, G. S., Wade, M. J., Free, A., Jones, C. L. W., & Stead, S. M. (2016). Profiling bacterial communities associated with sediment-based aquaculture bioremediation systems under contrasting redox regimes. Scientific Reports, 6(1), 38850. <https://doi.org/10.1038/srep38850>

Rodgers, C. J., Mohan, C. V., & Peeler, E. J. (2011). The spread of pathogens through trade in aquatic animals and their products. Rev sci tech Off int Epiz, 30(1), 241-256.

Rodgers, C. J. (with Office international des épizooties). (2001). Risk analysis in aquatic animal health: Proceedings of an International Conference held in Paris, France, 8-10 february 2000. OIE.

Roosta, H. R. (2014). Effects of Foliar Spray of K on Mint, Radish, Parsley and Coriander Plants in Aquaponic System. Journal of Plant Nutrition, 37(14), 2236–2254. <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.920385>

Roosta, H. R., & Hamidpour, M. (2011). Effects of foliar application of some macro- and micro-nutrients on tomato plants in aquaponic and hydroponic systems. Scientia Horticulturae, 129(3), 396–402. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.04.006>

Roosta, H. R., & Mohsenian, Y. (2012). Effects of foliar spray of different Fe sources on pepper (*Capsicum annum* L.) plants in aquaponic system. Scientia Horticulturae, 146, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.08.018>

Roques, J. A. C., Schram, E., Spanings, T., Van Schaik, T., Abbink, W., Boerrigter, J., De Vries, P., Van De Vis, H., & Flik, G. (2015). The impact of elevated water nitrite concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). Aquaculture Research, 46(6), 1384–1395. <https://doi.org/10.1111/are.12292>

Ross, L. G. (2000). Environmental physiology and energetics. In M. C. M. Beveridge & B. J. McAndrew (Hrsg.), Tilapias: Biology and Exploitation. S. 89–128. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4008-9_4

- Ru, D., Liu, J., Hu, Z., Zou, Y., Jiang, L., Cheng, X., & Lv, Z. (2017). Improvement of aquaponic performance through micro- and macro-nutrient addition. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(19), 16328–16335. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9273-1>
- Rueda, P. A. (2004). Towards assessment of welfare in African catfish, *Clarias gariepinus*: The first step. (Dissertation). Wageningen University. ISBN: 90-5808-941-X
- Sallehudin, M. F., Yusoff, N. A., Tan, N. H., Saad, S., & Mukai, Y. (2017). Optimum light wavelength and light intensity for rearing juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Int. J. of Aquatic Science*, 8(2), 107–112., 8, 1007–1112.
- Sallenave, R. (2016). Important water quality parameters in aquaponics systems. Las Cruces, NM, USA: College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences.
- Sambo, P., Nicoletto, C., Giro, A., Pii, Y., Valentinuzzi, F., Mimmo, T., Lugli, P., Orzes, G., Mazzetto, F., Astolfi, S., Terzano, R., & Cesco, S. (2019). Hydroponic Solutions for Soilless Production Systems: Issues and Opportunities in a Smart Agriculture Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 10, 923. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00923>
- Samocha, T. M., Lawrence, A. L., & Bray, W. A. (1993). Design and operation of an intensive nursery raceway system for penaeid shrimp. *CRC handbook of mariculture: Crustacean aquaculture*, 173–210.
- Santos, F. A. C., Boaventura, T. P., Da Costa Julio, G. S., Cortezzi, P. P., Figueiredo, L. G., Favero, G. C., Palheta, G. D. A., De Melo, N. F. A. C., & Luz, R. K. (2021). Growth performance and physiological parameters of *Colossoma macropomum* in a recirculating aquaculture system (RAS): Importance of stocking density and classification. *Aquaculture*, 534, 736274. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736274>
- Saraiva, J. L., Rachinas-Lopes, P., & Arechavala-Lopez, P. (2022). Finding the “golden stocking density”: A balance between fish welfare and farmers’ perspectives. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 930221. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.930221>
- Savidov, N. A., Hutchings, E., & Rakocy, J. E. (2007). Fish and plant production in a recirculating aquaponic system: A new approach to sustainable agriculture in Canada. *Acta Horticulturae*, 742, 209–221. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.742.28>
- Schleyken, J., Gumpert, F., Tränckner, S., Palm, H. W., & Tränckner, J. (2024). Enhanced chemical recovery of phosphorus from residues of recirculating aquaculture systems (RAS). *International Journal of Environmental Science and Technology*, 21(4), 3775–3788. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-05226-8>
- Schmenner, R. W. (2001). Looking ahead by looking back: Swift, even flow in the history of manufacturing. *Production and Operations Management*, 10(1), 87–96. <https://doi.org/10.1111/j.1937-5956.2001.tb00069.x>
- Schneider, O., Sereti, V., Eding, E. H., & Verreth, J. A. J. (2005). Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 32(3–4), 379–401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.09.001>
- Schram, E., Roques, J. A. C., Abbink, W., Spanings, T., De Vries, P., Bierman, S., De Vis, H. V., & Flik, G. (2010). The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 306(1–4), 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.005>

Schram, E., Roques, J. A. C., Abbink, W., Yokohama, Y., Spanings, T., De Vries, P., Bierman, S., Van De Vis, H., & Flik, G. (2014). The impact of elevated water nitrate concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture Research*, 45(9), 1499–1511. <https://doi.org/10.1111/are.12098>

Schreck, C. B., Tort, L., Farrell, A., & Brauner, C. (2016). *Biology of stress in fish* (Vol. 35). Academic Press. ISBN: 978-0-12-802728-8

Schulz-Mirbach, T., Ladich, F., Plath, M., & Heß, M. (2019). Enigmatic ear stones: What we know about the functional role and evolution of fish otoliths. *Biological Reviews*, 94(2), 457–482. <https://doi.org/10.1111/brv.12463>

Schwassmann, H. O. (1971). Biological rhythms. *Fish Physiology*, Vol. VI (eds W.S. Hoar & D.J. Randall), pp. 371–428. Academic Press, New York., 371–428.

Schwitzguébel, J.-P., & Wang, H. (2007). Environmental impact of aquaculture and countermeasures to aquaculture pollution in China. *Environmental Science and Pollution Research - International*, 14(7), 452–462. <https://doi.org/10.1065/espr2007.05.426>

Sebastian, A. (2009). Development of safety and quality management system in shrimp farming. (Dissertation). Cochin University of Science and Technology.

Seginer, I., & Mozes, N. (2012). A note on oxygen supply in RAS: The effect of water temperature. *Aquacultural Engineering*, 50, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.03.005>

Shafiei Sabet, S., Van Dooren, D., & Slabbekoorn, H. (2016). Son et lumière: Sound and light effects on spatial distribution and swimming behavior in captive zebrafish. *Environmental Pollution*, 212, 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.046>

Shahid, M., Austruy, A., Echevarria, G., Arshad, M., Sanaullah, M., Aslam, M., Nadeem, M., Nasim, W., & Dumat, C. (2014). EDTA-Enhanced Phytoremediation of Heavy Metals: A Review. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 23(4), 389–416. <https://doi.org/10.1080/15320383.2014.831029>

Shourbela, R. M., Waleed, N., & Abd El-Rahman, S. H. (2016). Interactive Effects of Stocking Density and Feed Type on Growth, Survival and Cannibalism Among African Catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822). *Journal Animal and Feed Research*, 6(3), 73–82., 6, 73–82.

Shuhaimi-Othman, M., Yakub, N., Ramle, N.-A., & Abas, A. (2015). Comparative toxicity of eight metals on freshwater fish. *Toxicology and Industrial Health*, 31(9), 773–782. <https://doi.org/10.1177/0748233712472519>

Sierra-Flores, R., Atack, T., Migaud, H., & Davie, A. (2015). Stress response to anthropogenic noise in Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquacultural Engineering*, 67, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2015.06.003>

Sierra-Flores, R., Davie, A., Grant, B., Carboni, S., Atack, T., & Migaud, H. (2016). Effects of light spectrum and tank background colour on Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae performances. *Aquaculture*, 450, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.041>

Sigray, P., & Andersson, M. H. (2011). Particle motion measured at an operational wind turbine in relation to hearing sensitivity in fish. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 130(1), 200–207. <https://doi.org/10.1121/1.3596464>

- Sillanpää, M. (1997). Environmental Fate of EDTA and DTPA. In G. W. Ware (Hrsg.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Bd. 152, S. 85–111). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1964-4_3
- Sillanpää, M., & Oikari, A. (1996). Assessing the impact of complexation by EDTA and DTPA on heavy metal toxicity using microtox bioassay. *Chemosphere*, 32(8), 1485–1497. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(96\)00057-4](https://doi.org/10.1016/0045-6535(96)00057-4)
- Simpson, S. D., Radford, A. N., Nedelec, S. L., Ferrari, M. C. O., Chivers, D. P., McCormick, M. I., & Meekan, M. G. (2016). Anthropogenic noise increases fish mortality by predation. *Nature Communications*, 7(1), 10544. <https://doi.org/10.1038/ncomms10544>
- Siqwepu, O., Salie, K., & Goosen, N. (2020). Evaluation of chelated iron and iron sulfate in the diet of African catfish, *Clarias gariepinus* to enhance iron excretion for application in integrated aquaponics systems. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(4), 1034–1053. <https://doi.org/10.1111/jwas.12697>
- Skelton, P. H., & Norris, S. M. (1996). A complete guide to the freshwater fishes of southern Africa. *Copeia*, Vol. 1996, No. 3. (Aug. 1, 1996), pp. 755–757., 3, 755–757.
- Skidmore, J. F. (1970). Respiration and Osmoregulation in Rainbow Trout with Gills Damaged by Zinc Sulphate. *Journal of Experimental Biology*, 52(2), 481–494. <https://doi.org/10.1242/jeb.52.2.481>
- Soeprijanto, A., & Islamy, R. A. (2023). The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPKs) Expression and Primary Stress Hormone (Cortisol) of *Clarias* sp. Juvenile in Different Light Intensity. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 12(1), 49–56., 12, 49–56.
- Somerville, C., Cohen, M., Pantanella, E., Stankus, A., & Lovatelli, A. (2014). Small-scale aquaponic food production: Integrated fish and plant farming. *FAO Fisheries and aquaculture technical paper*, (589), I., 589.
- Sorensen, E. M. (1991). *Metal poisoning in fish*. Environmental and Life Sciences Associates. CRC Press. ISBN:0-8493-4268-6
- Speaks, C. E. (2024). *Introduction to Sound: Acoustics for the Hearing and Speech Sciences* (5th ed). Plural Publishing, Incorporated.
- Spry, D. J., & Wood, C. M. (1984). Acid-base, plasma ion and blood gas changes in rainbow trout during short term toxic zinc exposure. *Journal of Comparative Physiology B*, 154(2), 149–158. <https://doi.org/10.1007/BF00684139>
- Stathopoulou, P., Berillis, P., Levizou, E., Sakellariou-Makrantonaki, M., Kormas, A. K., Angelaki, A., & Mente, E. (2018). Basil and Nile tilapia production in a small scale aquaponic system. *Journal of FisheriesSciences.com*, 12(4), 1–3., 12, 1–3.
- Stathopoulou, P., Tsoumalakou, E., Levizou, E., Vanikiotis, T., Zaoutsos, S., & Berillis, P. (2021). Iron and Potassium Fertilization Improve Rocket Growth without Affecting Tilapia Growth and Histomorphology Characteristics in Aquaponics. *Applied Sciences*, 11(12), 5681. <https://doi.org/10.3390/app11125681>
- Stigebrandt, A. (2011). Carrying capacity: General principles of model construction: Carrying capacity: general modelling principles. *Aquaculture Research*, 42, 41–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02674.x>

- Stigebrandt, A., Aure, J., Ervik, A., & Hansen, P. K. (2004). Regulating the local environmental impact of intensive marine fish farming. *Aquaculture*, 234(1–4), 239–261. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.029>
- Strauch, S. M., Bahr, J., Baßmann, B., Bischoff, A. A., Oster, M., Wasenitz, B., & Palm, H. W. (2019). Effects of Ortho-Phosphate on Growth Performance, Welfare and Product Quality of Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Fishes*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.3390/fishes4010003>
- Strauch, S. M., Wenzel, L. C., Bischoff, A., Dellwig, O., Klein, J., Schüch, A., Wasenitz, B., & Palm, H. W. (2018). Commercial African Catfish (*Clarias gariepinus*) Recirculating Aquaculture Systems: Assessment of Element and Energy Pathways with Special Focus on the Phosphorus Cycle. *Sustainability*, 10(6), 1805. <https://doi.org/10.3390/su10061805>
- Stumm, W., & Morgan, J. J. (1996). *Aquatic chemistry: Chemical equilibria and rates in natural waters* (Third edition). John Wiley & Sons, Inc.
- Subasinghe, R. P., MacGladdery, S. E., Hill, B. J., & FAO (Hrsg.). (2004). *Surveillance and zoning for aquatic animal diseases*. Vol. 451. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Swaleh, S. B., Bandy, U. Z., Asadi, M.-A., & Usmani, N. (2020). Biochemical profile and gene expression of *Clarias gariepinus* as a signature of heavy metal stress. *Environmental Pollution*, 264, 114693. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114693>
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1–4), 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015>
- Taha, M. F., Abdalla, A., ElMasry, G., Gouda, M., Zhou, L., Zhao, N., Liang, N., Niu, Z., Hassanein, A., Al-Rejaie, S., He, Y., & Qiu, Z. (2022). Using Deep Convolutional Neural Network for Image-Based Diagnosis of Nutrient Deficiencies in Plants Grown in Aquaponics. *Chemosensors*, 10(2), 45. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10020045>
- Takahashi-Kariyazono, S., Tanaka, H., & Terai, Y. (2017). Gene duplications and the evolution of c-type lysozyme during adaptive radiation of East African cichlid fish. *Hydrobiologia*, 791(1), 7–20. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2892-6>
- Tanudjaja, Y. (2021). Early warning signs and dynamics of H₂S production in recirculating aquaculture system. Master's thesis, NTNU. <https://hdl.handle.net/11250/2785488>
- Tellbüscher, A. A., Van Hullebusch, E., Gebauer, R., & Mráz, J. (2024). Assessing the fate and behaviour of plant nutrients in aquaponic systems by chemical equilibrium modelling: A meta-analytical approach. *Water Research*, 264, 122226. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122226>
- Temple, S. E. (2011). Why different regions of the retina have different spectral sensitivities: A review of mechanisms and functional significance of intraretinal variability in spectral sensitivity in vertebrates. *Visual Neuroscience*, 28(4), 281–293. <https://doi.org/10.1017/S0952523811000113>
- Teugels, G. G. (1986). A systematic revision of the African species of the genus *Clarias* (Pisces; Clariidae). *Annales Musee Royal de l'Afrique Centrale*, 247, 1-199., 247, 1–199.
- Thurston, R. V., Russo, R. C., & Vinogradov, G. A. (1981). Ammonia toxicity to fishes. Effect of pH on the toxicity of the unionized ammonia species. *Environmental science & technology*, 15(7), 837-840., 17, 837–840.

- Tidwell, J. H. (Hrsg.). (2012). *Aquaculture Production Systems* (1. Aufl.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118250105>
- Timmons, M. B., Guerdat, T., & Vinci, B. J. (2018). Water quality. In *Recirculating Aquaculture* 4th ed. Publisher: Ithaca Publishing Company LLC, Ithaca, NY, USA, pp. 2758.
- Toko, I., Fiogbe, E. D., Koukpode, B., & Kestemont, P. (2007). Rearing of African catfish (*Clarias gariepinus*) and vundu catfish (*Heterobranchus longifilis*) in traditional fish ponds (whedos): Effect of stocking density on growth, production and body composition. *Aquaculture*, 262(1), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.054>
- Tolentino, L. K. S., De Pedro, C. P., Icamina, J. D., Navarro, J. B. E., Salvacion, L. J. D., Sobrevilla, G. C. D., Villanueva, A. A., Amado, T. M., Padilla, M. V. C., Madrigal, G. A. M., & Enriquez, L. A. C. (2021). Development of an IoT-based Intensive Aquaculture Monitoring System with Automatic Water Correction. *International Journal of Computing and Digital Systems*, 10(1), 1355–1365. <https://doi.org/10.12785/ijcds/1001120>
- Torno, J., Einwächter, V., Schroeder, J. P., & Schulz, C. (2018). Nitrate has a low impact on performance parameters and health status of on-growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in RAS. *Aquaculture*, 489, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.043>
- Tromans, D. (2000). Modeling Oxygen Solubility in Water and Electrolyte Solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39(3), 805–812. <https://doi.org/10.1021/ie990577t>
- Turcios, A., & Papenbrock, J. (2014). Sustainable Treatment of Aquaculture Effluents—What Can We Learn from the Past for the Future? *Sustainability*, 6(2), 836–856. <https://doi.org/10.3390/su6020836>
- Turnbull, J. F., & Huntingford, F. A. (2012). Welfare and aquaculture: Where BeneFish fits in Aquaculture Economics & Management, 16(4), 433–440. <https://doi.org/10.1080/13657305.2012.729249>
- Turnsek, M., Joly, A., Thorarinsdottir, R., & Junge, R. (2020). Challenges of Commercial Aquaponics in Europe: Beyond the Hype. *Water*, 12(1), 306. <https://doi.org/10.3390/w12010306>
- Tyson, R. V., Simonne, E. H., & Treadwell, D. (2012). Aquaponics—Sustainable vegetable and fish co-production. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* (Vol. 125, pp. 381–385)., 125, 381–385.
- Tyson, R. V., Simonne, E. H., Treadwell, D. D., White, J. M., & Simonne, A. (2008). Reconciling pH for Ammonia Biofiltration and Cucumber Yield in a Recirculating Aquaponic System with Perlite Biofilters. *HortScience*, 43(3), 719–724. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.3.719>
- Tyson, R. V., Simonne, E. H., White, J. M., & Lamb, E. M. (2004). Reconciling water quality parameters impacting nitrification in aquaponics: The pH levels. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* (Vol. 117, pp. 79–83).
- Ullmann, J. F. P., Gallagher, T., Hart, N. S., Barnes, A. C., Smullen, R. P., Collin, S. P., & Temple, S. E. (2011). Tank color increases growth, and alters color preference and spectral sensitivity, in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 322–323, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.005>
- Ulonska, M. (1999). pH-Wert, Redoxspannung, Leitfähigkeit. In H.-J. Gevatter (Hrsg.), *Handbuch der Meß- und Automatisierungstechnik* (S. 263–280). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07701-6_11

UNESCO. (1981). The Practical Salinity Scale 1978 and the International Equation of State of Seawater 1980. (UNESCO Technical Papers in Marine Science, No. 36). Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.

Vadas, T. M., Zhang, X., Curran, A. M., & Ahner, B. A. (2007). Fate of DTPA, EDTA, and EDDS in Hydroponic Media and Effects on Plant Mineral Nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 30(8), 1229–1246. <https://doi.org/10.1080/01904160701555119>

Van Bussel, C. G. J., Schroeder, J. P., Mahlmann, L., & Schulz, C. (2014). Aquatic accumulation of dietary metals (Fe, Zn, Cu, Co, Mn) in recirculating aquaculture systems (RAS) changes body composition but not performance and health of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquacultural Engineering*, 61, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.05.003>

Van Dam, R. A., Barry, M. J., Ahokas, J. T., & Holdway, D. A. (1996). Comparative acute and chronic toxicity of diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) and ferric-complexed DTPA to *Daphnia carinata*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31(4), 433–443. <https://doi.org/10.1007/BF00212425>

Van De Nieuwegiessen, P. G., Boerlage, A. S., Verreth, J. A. J., & Schrama, J. W. (2008). Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. *Applied Animal Behaviour Science*, 115(3–4), 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.05.008>

Van De Nieuwegiessen, P. G., Olwo, J., Khong, S., Verreth, J. A. J., & Schrama, J. W. (2009). Effects of age and stocking density on the welfare of African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. *Aquaculture*, 288(1–2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.009>

Van Oijen, M. (1995). Key to Lake Victoria fishes other than haplochromine cichlids. Fish stocks and fisheries of Lake Victoria: A handbook for field observations. Samara. Publishing Limited, Dyfed, Great Britain, 209-300.

Verordnung (EG) 710/2009 der Kommission vom 5. August 2009 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 889/2008. Chapter 15 Volume 012 P. 253 – 272.

Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“). ABl. L 84 vom 31.3.2016, S. 1–208. ELI: <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/429/oj>

Verordnung (EU) 2018/848 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. Mai 2018 über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen sowie zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates. ABl. L 150 vom 14.6.2018, S. 1–92.

Verordnung (EU) Nr. 1380/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11. Dezember 2013 über die Gemeinsame Fischereipolitik und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1954/2003 und (EG) Nr. 1224/2009 des Rates sowie zur Aufhebung der Verordnungen (EG) Nr. 2371/2002 und (EG) Nr. 639/2004 des Rates und des Beschlusses 2004/585/EG des Rates. ABl. L 354 vom 28.12.2013, S. 22–61.

Versieck, J., & Cornelis, R. (1989). Trace elements in human plasma or serum. CRC Press

Viljoen, A., Steyn, G. J., Van Vuren, J. H. J., & Wade, P. W. (2003). Zinc Effects on the Embryos and Larvae of the Sharptooth Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(5), 1022–1027. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0085-2>

- Villanueva, R. R., Araneda, M. E., Vela, M., & Seijo, J. C. (2013). Selecting stocking density in different climatic seasons: A decision theory approach to intensive aquaculture. *Aquaculture*, 384–387, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.12.014>
- Volpato, G. L., & Barreto, R. E. (2001). Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(8), 1041–1045. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000800011>
- Voogt, W., & Sonneveld, C. (2017). Zn availability in nutrient solutions for cucumber (*Cucumis sativus* L.) in hydroponics as affected by Fe-chelates and pH. *Acta Horticulturae*, 1176, 95–100. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1176.13>
- Walker, G. M. (2007). Chapter 4 Drum Granulation Processes. In *Handbook of Powder Technology*. Bd. 11, S. 219–254. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0167-3785\(07\)80039-X](https://doi.org/10.1016/S0167-3785(07)80039-X)
- Wang, C., Li, Z., Wang, T., Xu, X., Zhang, X., & Li, D. (2021). Intelligent fish farm—The future of aquaculture. *Aquaculture International*, 29(6), 2681–2711. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00773-8>
- Wang, H., Inukai, Y., & Yamauchi, A. (2006). Root Development and Nutrient Uptake. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(3), 279–301. <https://doi.org/10.1080/07352680600709917>
- Wang, Z.-T., Akamatsu, T., Nowacek, D. P., Yuan, J., Zhou, L., Lei, P.-Y., Li, J., Duan, P.-X., Wang, K.-X., & Wang, D. (2019). Soundscape of an Indo-Pacific humpback dolphin (*Sousa chinensis*) hotspot before windfarm construction in the Pearl River Estuary, China: Do dolphin engage in noise avoidance and passive eavesdropping behavior? *Marine Pollution Bulletin*, 140, 509–522. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.013>
- Warnick, S. L., & Bell, H. L. (1969). The acute toxicity of some heavy metals to different species of aquatic insects. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 280–284., 280–284.
- Wasenitz, B., Karl, H., & Palm, H. W. (2018). Composition and quality attributes of fillets from different catfish species on the German market. *Journal of Food Safety and Food Quality-Archiv Für Lebensmittelhygiene*, 69(2). <https://doi.org/10.31083/0003-925X-69-57>
- Weiner, E. R. (2008). *Applications of Environmental Aquatic Chemistry: A Practical Guide*, Second Edition. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420008371>
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3), 591–625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>
- Wenzel, L. C. (2023). Cultivation of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) in Recirculating Aquaculture Systems (RAS) in Northern Germany. (Dissertation). University of Rostock.
- Wenzel, L. C., Berchtold, E., & Palm, H. W. (2022). Effects of stocking density and grading on behaviour, cannibalism and performance of African catfish (*Clarias gariepinus*) fry. *Aquaculture Reports*, 27, 101400. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101400>
- Wenzel, L. C., Strauch, S. M., Eding, E., Presas-Basalo, F. X., Wasenitz, B., & Palm, H. W. (2021). Effects of Dissolved Potassium on Growth Performance, Body Composition, and Welfare of Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Fishes*, 6(2), 11. <https://doi.org/10.3390/fishes6020011>
- Westin, L., & Gydemo, R. (1986). Influence of light and temperature on reproduction and moulting frequency of the crayfish, *Astacus astacus* L. *Aquaculture*, 52(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90106-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90106-7)

- Weyl, O. L. F., & Booth, A. J. (2008). Validation of annulus formation in otoliths of a temperate population of adult African sharptooth catfish *Clarias gariepinus* using fluorochrome marking of wild fish. *Journal of Fish Biology*, 73(4), 1033–1038. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01975.x>
- Wood, C. M. (2017). Toxic responses of the gill. In *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts*. S. 1–89. CRC Press.
- Wimmer, U., Wang, Y., Georgiev, O., & Schaffner, W. (2005). Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. *Nucleic acids research*, 33(18), 5715–5727.
- Wourms, J. P. (1997). The Rise of Fish Embryology in the Nineteenth Century. *American Zoologist*, 37(3), 269–310. <https://doi.org/10.1093/icb/37.3.269>
- Wu, D., Liu, T., Deng, S., Han, R., & Xu, Y. (2017). SLC39A4 expression is associated with enhanced cell migration, cisplatin resistance, and poor survival in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*, 7(1), 7211. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07830-4>
- Wu, X., Peters, B. J., Rithner, C. D., & Crans, D. C. (2016). Multinuclear NMR studies of aqueous vanadium–HEDTA complexes. *Polyhedron*, 114, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.01.001>
- Wysocki, L. E., Dittami, J. P., & Ladich, F. (2006). Ship noise and cortisol secretion in European freshwater fishes. *Biological Conservation*, 128(4), 501–508. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.10.020>
- Xu, C., Su, G., Zhao, K., Wang, H., Xu, X., Li, Z., Hu, Q., & Xu, J. (2023). Assessment of greenhouse gases emissions and intensity from Chinese marine aquaculture in the past three decades. *Journal of Environmental Management*, 329, 117025. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.117025>
- Xu, L., Ziethen, C. J., Appelbaum, S., Palm, H. W., & Knaus, U. (2022). Aquaponics Production of Wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) in Different Horticultural Substrates with African Catfish (*Clarias gariepinus*) in Northern Germany. *AgriEngineering*, 4(4), 1076–1094. <https://doi.org/10.3390/agriengineering4040067>
- Xylem. UV-Licht und Ozon für die Wasseraufbereitung in der Aquakultur, Wasseraufbereitung in Aquakultur. (2021). Xylem GmbH. (20200415 August 2021). https://www.xylem.com/siteassets/industries--applications/resources/aquaculture/b_wedeco-aquaculture_0520_de_low.pdf
- Yamaguchi, S., Miura, C., Ito, A., Agusa, T., Iwata, H., Tanabe, S., Tuyen, B. C., & Miura, T. (2007). Effects of lead, molybdenum, rubidium, arsenic and organochlorines on spermatogenesis in fish: Monitoring at Mekong Delta area and in vitro experiment. *Aquatic Toxicology*, 83(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.03.010>
- Yanong, R. P., & Erlacher-Reid, C. (2012). Biosecurity in aquaculture, part 1: An overview. *SRAC publication*, 4707, 522.
- Yep, B., & Zheng, Y. (2019). Aquaponic trends and challenges – A review. *Journal of Cleaner Production*, 228, 1586–1599. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.290>
- Yildiz, H. Y., Köksal, G., Borazan, G., & Benli, Ç. K. (2006). Nitrite-induced methemoglobinemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(5), 427–426. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00761.x>
- Yogalakshmi, K. N., & Joseph, K. (2010). Effect of transient sodium chloride shock loads on the performance of submerged membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 101(18), 7054–7061. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.135>

- Ytrestøl, T., Takle, H., Kolarevic, J., Calabrese, S., Timmerhaus, G., Rosseland, B. O., Teien, H. C., Nilsen, T. O., Handeland, S. O., Stefansson, S. O., Ebbesson, L. O. E., & Terjesen, B. F. (2020). Performance and welfare of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. post-smolts in recirculating aquaculture systems: Importance of salinity and water velocity. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(2), 373–392. <https://doi.org/10.1111/jwas.12682>
- Yunta, F., García-Marco, S., Lucena, J. J., Gómez-Gallego, M., Alcázar, R., & Sierra, M. A. (2003). Chelating Agents Related to Ethylenediamine Bis(2-hydroxyphenyl)acetic Acid (EDDHA): Synthesis, Characterization, and Equilibrium Studies of the Free Ligands and Their Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , and Fe^{3+} Chelates. *Inorganic Chemistry*, 42(17), 5412–5421. <https://doi.org/10.1021/ic034333j>
- Zeuner, F. E. (1963). A history of domesticated animals. Hutchinson. 560 pp. CABI Record Number: 19630102642
- Zhang, S.-Y., Li, G., Wu, H.-B., Liu, X.-G., Yao, Y.-H., Tao, L., & Liu, H. (2011). An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production. *Aquacultural Engineering*, 45(3), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.08.001>
- Zheng, J.-L., Zeng, L., Xu, M.-Y., Shen, B., & Wu, C.-W. (2017). Different effects of low- and high-dose waterborne zinc on Zn accumulation, ROS levels, oxidative damage and antioxidant responses in the liver of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(1), 153–163. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0275-6>
- Zhou, S., Zhang, B., Sturm, E., Teagarden, D. L., Schöneich, C., Kolhe, P., Lewis, L. M., Muralidhara, B. K., & Singh, S. K. (2010). Comparative Evaluation of Disodium Edetate and Diethylenetriaminepentaacetic Acid as Iron Chelators to Prevent Metal -Catalyzed Destabilization of a Therapeutic Monoclonal Antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(10), 4239–4250. <https://doi.org/10.1002/jps.22141>
- Pórarinsdóttir, R. I., Kledal, P. R., Skar, S. L. G., Sustaeta, F., Ragnarsdóttir, K. V., Mankasingh, U., Pantanella, E., Ven, R., & Shultz, C. (2015). Aquaponics guidelines.

Article

Effects of Stocking Density, Size, and External Stress on Growth and Welfare of African Catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) in a Commercial RAS

Björn Baßmann ^{1,*}, Lisa Hahn ^{1,2}, Alexander Rebl ³, Lisa Carolina Wenzel ¹, Marc-Christopher Hildebrand ¹, Marieke Verleih ³ and Harry Wilhelm Palm ¹

¹ Department of Aquaculture and Sea-Ranching, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, University of Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 6, 18059 Rostock, Germany

² Department of Marine Biology, Institute for Biological Sciences, University of Rostock, Albert-Einstein Straße 3, 18055 Rostock, Germany

³ Fish Genetics Unit, Institute of Genome Biology, Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany

* Correspondence: bjoern.bassmann@uni-rostock.de; Tel.: +49-(0)381-498-3745

Abstract: The effects of semi-intensive (100 kg m⁻³), intensive (200 kg m⁻³), and super-intensive (400 kg m⁻³) stocking densities on the growth and welfare of African catfish (*Clarias gariepinus*) were investigated under commercial production conditions. Plasma cortisol, glucose, and selected transcripts following a stress challenge, lactate, as well as skin lesions, were analyzed at regular intervals (from 12 g juveniles to 1.5–2.0 kg). The fish grew well, but after 23 weeks, the semi-intensively stocked fish had a mean final weight of 1830.5 g, significantly higher than the super-intensively stocked fish with 1615.4 g, and considerably higher than the intensively stocked fish with 1664.8 g ($p > 0.05$). Cortisol and glucose responses significantly differed between stressed and unstressed fish, but not between treatment groups. An unforeseen external stressor (nearby demolition noise) caused stress responses among all treatment groups, but was similarly coped with. Mortality ranged between 3.8–9.2%. In the juveniles, skin lesions were reduced under intensive or super-intensive densities, with the least under semi-intensive densities in outgrown fish. Expression profiles of 22 genes were compared in the spleen at semi-intensive and super-intensive densities. The transcript concentrations of most genes remained unchanged, except for *slc39a8* and *mtf1*, which were significantly downregulated in stressed catfish under semi-intensive conditions. We demonstrated that African catfish growth performance and welfare depend on age and stocking density, also reacting to demolition noise. This supports farm management to optimize stocking densities during the grow-out of African catfish in RAS and suggests avoiding external stress.

Keywords: cortisol; demolition noise; fish well-being; grading; growth performance; recirculating aquaculture; mortality



Citation: Baßmann, B.; Hahn, L.; Rebl, A.; Wenzel, L.C.; Hildebrand, M.-C.; Verleih, M.; Palm, H.W. Effects of Stocking Density, Size, and External Stress on Growth and Welfare of African Catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) in a Commercial RAS. *Fishes* **2023**, *8*, 74. <https://doi.org/10.3390/fishes8020074>

Academic Editor: Esther Leal

Received: 11 January 2023

Revised: 23 January 2023

Accepted: 24 January 2023

Published: 26 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In finfish aquaculture, stocking density is a pivotal factor and an issue of frequent debate, as it may be a source of chronic stress, leading to physiological alterations, including stress responses, growth reduction, and impairment of health [1–3]. Based on these indicators, fish welfare can be considered diminished [2,4–7]. According to Ellis et al. [2] (p. 494), “... the term ‘stocking density’ refers to the concentration at which fish are initially stocked into a system” (*sensu strictu*). However, most often, the term is used to describe the density of fish at any time. It may thus be understood as a dynamic factor, since the actual density increases or decreases as the fish grow or are removed from the rearing volume. Fish species in aquaculture are stocked at very different densities, typically ranging from < 10 to 100 kg m⁻³ [4,8]. This widely varies due to the different needs and/or tolerances of

the respective species. Similarly, the impact of a specific stocking density on the species' welfare may differ as well [6]. In Europe, fish farming is often industrialized and highly intensive [9]. According to Naylor et al. [10] (p. 1017), “intensification implies increasing the density of individuals, which requires greater use and management of inputs, greater generation of waste products, and increased potential for the spread of pathogens”. In this respect, particularly high, but also low stocking densities, may result in stress, poor fish health, and welfare [11–13], subsequently having a negative impact on the fish performance, which in turn may also have economic consequences [14,15].

A species whose global production in aquaculture has distinctly increased in recent years is the African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822). In Germany, production in recirculating aquaculture systems (RASs) increased from 318,575 kg per year^{−1} to 1,193,137 kg per year^{−1} between 2011 and 2019 [16,17]. In moderate climates, this warm-water species is farmed in RASs, while ponds are predominantly used in tropical and subtropical regions [18]. The African catfish has a very good feed conversion ratio (FCR), a high growth potential, and is highly tolerant towards adverse environmental conditions, such as low oxygen or elevated nitrogen compounds in the water [19,20]. This is based on its biological adaptations to its natural habitats, which are often characterized by shrinking water bodies or complete drainage during the dry season. Especially favorable is their ability to utilize atmospheric oxygen with their arborescent organs [21]. For this reason, African catfish are adapted to survive for some time, densely packed inside smaller pools or even in moist substrates and mud [20]. This attribute is utilized in commercial aquaculture by stocking this species up to super-intensive densities (max. 500 kg m^{−3}) [22].

Reduced growth, alteration of physiological processes, increased stress responses, and/or rise in mortality were described under high stocking densities [1,23–27]. According to van de Nieuwegiessen et al. [28], final densities between approx. 100–500 kg m^{−3} did not affect the growth and welfare of African catfish in a size range from approx. 1.0–1.5 kg fish^{−1}. In contrast, wellbeing improved with increasing stocking density in fish between approx. 100–300 g at final densities between 16.7–315 kg m^{−3}, as significantly fewer skin lesions occurred at the highest density. According to van de Nieuwegiessen et al. [22], African catfish juveniles between approx. 10–100 g showed a comparable growth performance and mortality at all the tested densities, but there was evidence that growth may be best at medium densities (175 kg m^{−3}) and worst at the higher densities (300 kg m^{−3}). Plasma cortisol, glucose, and lactate remained unaffected by stocking densities, and fish from both low (50 kg m^{−3}) and high densities (300 kg m^{−3}) showed no cortisol response to an additional acute stress challenge. The authors suggested an impaired cortisol response related to the downregulation of components of the hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis in fish as a result of chronic stress: the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) or cortisol receptors [22,29]. African catfish fry between approx. 0.1–0.3 g showed no significant differences in growth performance at stocking densities between 10–30 fish L^{−1}, but aggressive behavior was less frequent at higher stocking densities [30]. In juvenile African catfish (approx. 10–100 g) under extensive stocking densities (500 and 1125 fish m^{−3}), increased agonistic interactions during the first weeks were described. In contrast, mature African catfish from higher stocking densities showed the highest number of skin lesions after stress induction. In general, however, aggression and the number of lesions were described to decrease with age. It was suggested that both low and high stocking densities might impair welfare [22,28].

So far, most findings have originated from experiments in aquaria and not under commercial conditions. Therefore, the present study presents the growth performance and welfare of African catfish throughout an entire grow-out period in a commercial RAS under intensive conditions. We evaluate the dependence of current fish welfare indicators and the expression of several genes on fish size under three different stocking densities. In addition, the effect of an unforeseen external stressor during the experiment is discussed.

2. Materials and Methods

2.1. Production System, Maintenance, and Water Quality

A commercially scaled RAS at the aquaculture research facility ‘FishGlassHouse’ of the University of Rostock (Germany) was used for this experiment. It consisted of nine identical rearing tanks (each measuring (L × W × H) 1.8 × 1.0 × 0.7 m, 1.26 m³), a settling tank (1.76 m³, total effective surface area: 108.08 m²) to remove suspended solids from the water, a trickling filter (5.6 m², specific surface area: 125.00 m² m⁻³, total volume: 11.80 m³, total specific surface area: 1474.20 m²) for biological water treatment, and a sump (4.41 m³). The total system contained approximately 16.90 m³ of water [31]. An automatic temperature control/heater and a float switch for water level regulation were located in the sump. Tap water was used to replace evaporated water.

The water parameters of temperature, pH, oxygen concentration and saturation, electric conductivity (EC), salinity, and redox potential were controlled each day, after trickling filtration (before the rearing tanks) with a portable multimeter (Hach-Lange HQ40D, Germany). Weekly water samples were taken and analyzed in triplicate with an automatic photometric-analyzer (Gallery™, Thermo Fisher Scientific) to monitor concentrations of ammonium/ammonia (NH₄⁺/NH₃), nitrite (NO₂⁻), and nitrate (NO₃⁻). If the pH dropped below a threshold of 5, lime hydrate was added to the RAS or the water was changed in order to accordingly adjust the water quality. After starting the experiment, the settling tank was cleaned once a week; later, it was cleaned much more frequently to ensure system stability. The water quality parameters in the course of the experiment are summarized in Table 1.

Table 1. Water parameters as mean ± standard deviation (SD) and minimum/maximum values between samplings (T0–T1, T1–T2, etc.). The parameters were measured every day (or weekly *).

	Mean ± SD	Min/Max (T0–T1)	Min/Max (T1–T2)	Min/Max (T2–T3)	Min/Max (T3–T4)	Min/Max (T4–T5)
Temperature [°C]	26.1 ± 1.6	24.2/26.1	23.8/26.7	19.0/27.5	23.6/28.0	25.7/28.6
O ₂ [mg L ⁻¹]	6.0 ± 0.9	7.1/8.1	6.1/8.3	4.1/8.7	4.7/6.8	4.4/6.2
O ₂ [%]	74.0 ± 10.9	90.4/96.5	74.4/103.5	50.8/97.1	60.1/82.6	53.1/80.2
pH	6.7 ± 0.9	7.7/8.2	3.7/8.1	6.1/7.7	6.1/7.8	5.0/7.2
EC [μS cm ⁻¹]	1382 ± 451	762/883	906/1610	672/1520	814/2230	1371/2480
Salinity [‰]	0.7 ± 0.2	0.4/0.4	0.4/0.8	0.4/0.7	0.4/1.1	0.7/1.2
RedOx [mV]	160.1 ± 31.7	173.6/194.5	158.8/276.2	120.2/192.0	105.7/191.2	60.8/174.3
NH ₄ * [mg L ⁻¹]	13.60 ± 3.88	9.62/18.99	9.03/14.73	8.80/13.41	8.48/16.50	8.78/13.21
NO ₂ * [mg L ⁻¹]	0.19 ± 0.17	0.03/0.03	0.09/0.49	0.06/0.36	0.05/0.35	0.07/0.37
NO ₃ * [mg L ⁻¹]	475 ± 154	591/606	511/518	339/346	325/750	344/349

2.2. Fish Stocking, Feeding, and Growth

Three different treatment groups were compared with a semi-intensive (100 kg m⁻³), intensive (200 kg m⁻³) and super-intensive (400 kg m⁻³) stocking density. On 18 January 2021, a total of 1848 African catfish juveniles of mixed sex were obtained from a local farmer (Fischzucht Abtshagen GmbH & Co. KG, Abtshagen, Germany). The fish were randomly stocked with either 88, 176, or 352 fish in 3 of the 9 tanks (randomized block-design), respectively, to reach an approximate final weight of 100, 200, or 400 kg m⁻³ at a slaughter weight of 1.5 kg. From each stocking density, 100 individual weight and length measurements were recorded as representative samples. Since newly added individuals are often harassed, fish in this study were not graded in order to avoid affecting the respective group compositions, and thus possibly influencing the results.

The fish were fed with a catfish diet (Alltech Coppens, pellet sizes of 1.5–4.5 mm) according to a commercial feeding protocol from Alltech Coppens for African catfish of 10–2000 g at 5.62–0.84% BW d⁻¹. Feeding took place every two hours between 07:00 p.m.–05:00 a.m. by using automatic feeders. The FCR, the specific growth rate (SGR), and the condition index (CI) were calculated for each sampling date.

$$FCR = TFI/W_f - W_i \quad (1)$$

with TFI = total feed intake [g], W_i = initial fish weight [g], and W_f = final fish weight [g].

$$SGR = (\ln(W_f) - \ln(W_i))/t \times 100 \quad (2)$$

with W_i = initial fish weight [g] and W_f = final fish weight [g], t = days.

$$CI = \text{fish mass [g]} \times 100 / \text{fish length [cm]}^3 \quad (3)$$

After final sampling, the individual weights and total body lengths of 100 fish per stocking density were recorded again. The experiment was expected to last 5 to 6 months, depending on when the fish would reach their slaughter weight.

2.3. Sampling

All treatments were carried out in accordance with the EU guidelines 2010/63/EU for animal experiments and were approved by the relevant ethics committee.

The fish of the three treatment groups (semi-intensive, intensive, and super-intensive) were sampled at the beginning (i.e., after stocking and a one-week adaptation period) and regularly afterwards at 6-week intervals throughout the entire growth phase. In each sampling, three fish per tank (nine fish per treatment group) were anesthetized (eugenol bath, dosage: 50 mg L⁻¹) and blood sampled over their caudal blood vessels within 5 min. Another three fish per tank (nine fish per treatment group) were anesthetized and blood sampled after additional induced stress; i.e., after netting and 30-min confinement in a tub without water but under humidification. According to Martins et al. [32], air exposure up to 1 h is a rather moderate stressor for African catfish. In each case, blood glucose and lactate levels were determined in situ using test strips (Roche, Accu Check Aviva/Accutrend Plus, Mannheim, Germany). The remaining blood was anticoagulated (BD Vacutainer, 5.4mg K-EDTA, Franklin Lakes, NJ, USA) and stored on ice for later centrifugation (Hettich Universal 320 R, 10 min at 10,000 rpm and 4 °C, Tuttlingen, Germany). The plasma was separated from the cells. Cortisol was analyzed in the plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Cusabio fish cortisol, sensitivity: 0.0023 ng mL⁻¹, Wuhan, China) according to the manufacturer's instructions using a micro-plate reader at 450 nm (iMark, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The cortisol concentrations were then calculated using a standard curve with Curve Expert 1.4.

The number and area of skin lesions were recorded for each fish. In order to determine the lesion area, a clear template with a 0.25 cm² grid was placed over each lesion and the smallest possible area was recorded. All lesion areas per fish were then calculated. Sex, total body length, and weight were recorded. Each sampled fish was also implanted with a microchip (Mini Star ID, 1.4 × 8 mm) at an identical position, subcutaneously, close to the dorsal fin, in order to distinguish 'experimental fish' from accompanying fish, which were not sampled, later on. The latter were kept among the experimental fish to achieve the respective stocking densities. After sampling, the anesthetized fish were transferred to an aerated recovery tank and returned to their respective tanks after reflexes and reactivity were regained.

The final sampling was preponed by one week (in week 23 instead of week 24), because the fish had already reached their slaughter weight. Afterwards, all fish were weighed (in groups) and double checked for microchips. All fish with microchips were separated from the accompanying fish, properly stunned, killed, and separately disposed.

2.4. External Stressor

During the course of the experiment, at about the time of the third sampling, renovation work began in the adjacent building of the RAS facility used. This resulted in an unexpected stressor for the fish due to considerable noise impact. The demolition noise

occurred for several hours each day and continued for several weeks, especially covering samplings 3 and 4. Therefore, the experiment can be divided into three different phases, the regular experiment between sampling 1 and 2, the time where the demolition noise took place (samplings 3–4), and a phase without any further disturbance (sampling 5). The noise level was not acoustically measured, but as it involved chiseling off ceilings and rebuilding exterior facades with heavy machinery, it can be assumed that > 90 dB was reached [33].

2.5. RNA Isolation and Multiplex Quantitative PCR

Total RNA was extracted from individual spleens ($n = 3$ per group: stressed or unstressed fish under semi-intensive or super-intensive stocking densities from sampling 3 or sampling 5) using 1 mL TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After RNA purification using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands), the RNase-free DNase I (Qiagen) was used to digest residual DNA. Then, the concentration and the purity of the extracted RNA were assessed using a NanoDrop OneC spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, NC, USA).

The expression of four reference genes (*rna18s*, *rpl*, *actb*, *gapdh*) and twenty-two target genes (Table A1; [34]) was profiled in the extracted RNA specimens from all of the groups using the integrated fluidic circuit (IFC) technology of the Standard BioTools Gene Expression biochips. The multiplex quantitative PCR (qPCR) analyses were performed on one 48.48 IFC chip (Standard BioTools, South San Francisco, CA, USA) using the BioMark HD system (Standard BioTools). To this end, the total RNA was adjusted at a concentration of $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ and reverse-transcribed (42°C , 30 min) using the Reverse Transcription Master Mix (Standard BioTools). The resulting cDNA aliquots were mixed with primers ($100 \text{ } \mu\text{M}$) and the PreAmp master mix (Standard BioTools), and preamplified in 15 cycles (95°C , 15 s; 60°C , 4 min) in a TAdvanced thermocycler (Biometra, Jena, Germany). After this pre-amplification step, exonuclease I (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) was added to degrade single-stranded oligonucleotide primers, followed by a 30-min incubation period at 37°C . Then, $43 \text{ } \mu\text{L}$ TE buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added per sample and each $50\text{-}\mu\text{L}$ -cDNA sample was diluted in SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX (Bio-Rad) and $20 \times$ DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Standard BioTools) to produce the sample mixes. After priming the 48.48-IFC chip in the MX Controller (Standard BioTools), the primers and the sample mixes together with one no-template (water) control were transferred to the assay and sample inlets on the primed 48.48-IFC chip. Finally, multiplex qPCR was conducted following the manufacturer's thermal protocol 'GE Fast 48.48 PCR + Melt v2.pcl'.

2.6. Statistics

Statistical tests were conducted with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, v. 25, IBM Corp., 2017, Armonk, NY, USA) statistical software package. First, the resulting data were tested for distribution. Then, the non-parametric Kruskal-Wallis test by ranks and post hoc multiple range tests were conducted; Tukey's-HSD test for variance homogeneity and Dunnett-T3 test for variance inhomogeneity. Significance values were adjusted for several tests by the Bonferroni correction. All tests were performed with a significance level of $p < 0.05$.

For plasma cortisol and glucose, significances were only indicated within one sampling between stressed and unstressed fish of one single treatment group, as well as between stressed or unstressed fish of different treatment groups. No distinction was made between stressed and unstressed specimens for weight, length, CI, lactate, lesion number, and lesion area. Significances were indicated in this regard between treatment groups of one single sampling, as well as between similar treatment groups of different samplings.

The qPCR data were analyzed using the Fluidigm RealTime PCR Analysis Software (v. 4.5.2, South San Francisco, CA, USA) and normalized against the geometric mean of three suitable normalizer genes (*rna18s*, *actb*, *gapdh*). Copy numbers were calculated on the basis of ideal standard curves assuming a primer efficiency of 100%. GraphPad

Prism software (v. 9.1.0, San Diego, CA, USA) was used for the statistical analysis of the normalized qPCR data. Significant differences ($p < 0.05$) between the different groups were assessed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Holm-Šidák's post hoc test to correct for multiple comparisons.

3. Results

3.1. Fish Growth Performance

The mean initial and final weights and lengths of African catfish ($n = 100$) from the different stocking densities are given in Table 2. Before stocking, the weights of the representative sampling ($n = 100$) were statistically the same ($p > 0.05$). However, the lengths of the 100 fish measured in the intensive stocking density were found to be significantly different from both other groups. After 23 weeks, the mean weights in the semi-intensive density were about 200 g higher than in the higher stocking densities and significantly different from the super-intensive density ($p < 0.05$). In one semi-intensive and two super-intensive tanks, a few fish were caught due to organ sampling. That is why the stocking density is slightly lower at the end in these respective tanks. A comparative growth performance, including the CI of the fish from the three stocking densities over the course of the experiment based on sampling after 6 weeks each ($n = 18$), is given in the Appendix (Figures A1–A3).

Table 2. Initial and final weights and total body lengths of African catfish (mean $\pm$ standard deviation, SD, $n = 100$), $p > 0.05$, superscripts indicate significant differences between the groups.

	Intended Stocking Density	n Fish Tank ⁻¹	Mean Weight Fish ⁻¹ [g] $\pm$ SD	Mean Lengths Fish ⁻¹ [cm] $\pm$ SD	<i>de facto</i> Density Tank ⁻¹ [kg m ⁻³]
Before stocking	Semi-intensive (0.84 kg m ⁻³)	88	12.5 $\pm$ 1.9	12.1 $\pm$ 0.7 ^a	0.87
		88			0.87
		88			0.87
	Intensive (1.68 kg m ⁻³)	176	12.4 $\pm$ 1.9	11.6 $\pm$ 0.8 ^b	1.72
		176			1.72
		176			1.72
	Super-intensive (3.35 kg m ⁻³)	352	12.2 $\pm$ 1.6	12.0 $\pm$ 0.6 ^a	3.41
		352			3.41
		352			3.41
After 23 weeks	Semi-intensive (100 kg m ⁻³)	55	1830.5 $\pm$ 596.7 ^a	57.3 $\pm$ 6.3	89.15 *
		73			106.40
		73			106.85
	Intensive (200 kg m ⁻³)	161	1664.8 $\pm$ 588.5 ^{a,b}	55.6 $\pm$ 7.8	230.62
		161			212.34
		163			214.96
	Super-Intensive (400 kg m ⁻³)	284	1615.4 $\pm$ 451.7 ^b	56.1 $\pm$ 5.1	364.52 *
		313			401.13
		309			396.60 *

* deviation due to organ samplings.

The FCR tended to increase in all three stocking densities. Between the second-last and final sampling (T4 and T5, Table 3), the intensive stocking density showed the lowest FCR and, therefore, the best feed conversion rate. Throughout the entire experiment, the super-intensive stocking density showed the comparatively weakest FCR. The SGR decreased with increasing age or weight of the fish. Comparing the three stocking densities, the highest SGR values were recorded under an intensive stocking density between T0 and T1, T2 and T4, and between T4 and T5 (Table 3).

3.2. Evaluation of Fish Welfare

Mortality varied between the rearing tanks, ranging from 2.59% to 14.62% (Table 4). The intensive stocking density showed the lowest mortality in total, while the super-intensive stocking density showed the highest mortality on average ($p > 0.05$). No increased mortality was observed during the phase of demolition noise.

Table 3. The feed conversion ratio (FCR) and specific growth rate (SGR) of African catfish 1 week after stocking (T0–T1), after 6 weeks (T1–T2), after 12 weeks (T2–T3), after 18 weeks (T3–T4), and after 23 weeks, at the final weighing of all fish (T4–T5). Calculations are based on sub-samplings ($n = 18$ per group), except totals (right column).

Stocking Density		T0–T1	T1–T2	T2–T3	T3–T4	T4–T5	T0–T5 (in Total)
Semi-intensive (100 kg m ⁻³)	FCR	0.7	0.7	0.8	0.7	1.1	0.77
	SGR [% d ⁻¹]	7.0	6.0	2.2	1.7	0.9	3.0
Intensive (200 kg m ⁻³)	FCR	0.6	0.7	0.7	0.9	0.8	0.75
	SGR [% d ⁻¹]	7.8	5.8	2.4	1.4	1.2	3.0
Super-intensive (400 kg m ⁻³)	FCR	0.7	0.7	0.8	0.8	1.2	0.83
	SGR [% d ⁻¹]	6.8	6.0	2.3	1.6	0.7	2.9

Table 4. Mortality in the three treatment groups with semi-intensive, intensive, and super-intensive stocking densities ($p > 0.05$).

Stocking Density	Mortality Tank ⁻¹ [%]	Mean [%] ± SD
Semi-intensive (100 kg m ⁻³)	2.59	7.12 ± 3.92
	9.56	
	9.20	
Intensive (200 kg m ⁻³)	3.89	3.79 ± 0.59
	4.32	
	3.16	
Super-Intensive (400 kg m ⁻³)	14.62	9.24 ± 4.80
	7.71	
	5.40	

The mean plasma cortisol responses of samplings 1, 2, 4, and 5 were in a range of 2.7 to 24.1 ng mL⁻¹ (Figure 1). Significant differences between unstressed and stressed fish, but not between the different stocking densities, were found within the respective samplings. At the first sampling, the cortisol responses were identical between stressed and unstressed fish kept at the super-intensive stocking density. The highest cortisol levels during the experiment, with most values between 17.1 and 32.2 ng mL⁻¹, were recorded in the third sampling, meaning the beginning of the second phase of the experiment, when the demolition noise likely affected the fish. However, during the fourth sampling, cortisol levels had already returned to the normal range, although the demolition noise was still ongoing. All relevant significances within a single sampling between unstressed and stressed fish in a treatment group, as well as between unstressed or stressed fish in a treatment group between different samplings, are given in Table A2.

Blood glucose mainly ranged between 3.8 and 8.1 mmol L⁻¹. There were significant differences between unstressed and stressed fish within the sampling groups. However, there were no significant differences between different stocking densities within a single sampling. Notably, the mean glucose values mainly were higher at the third sampling, and the interquartile ranges and upper Whiskers were mostly wider compared to the majority of boxplots at other samplings (Figure A4).

The lactate values mainly ranged between 2 and 8 mmol L⁻¹ (Figure 2). There were neither significant differences between the different stocking densities within one sampling nor between the samplings. Nevertheless, in the second phase of the experiment (under the influence of the demolition noise), i.e., from the third to the fourth sampling, all of the lactate values noticeably decreased and increased again to approximately their initial level at the fifth sampling.

Skin lesions due to agonistic interactions occurred during the entire experiment (Figures 3, 4 and A5). At the first and third sampling, several skin lesions per individual were found under all stocking densities, whereas at the second and fourth sampling,

the number of lesions decreased in general. At the first sampling, the semi-intensively stocked juveniles had the highest number of lesions, while at the fifth sampling, the adult fish had more lesions at intensive and super-intensive stocking densities compared to the semi-intensive stocking density. In particular, during the third sampling, meaning the beginning of the second phase (with noise impact), the highest number and largest skin lesions were determined in total. Significant differences ($p > 0.05$) were not found.

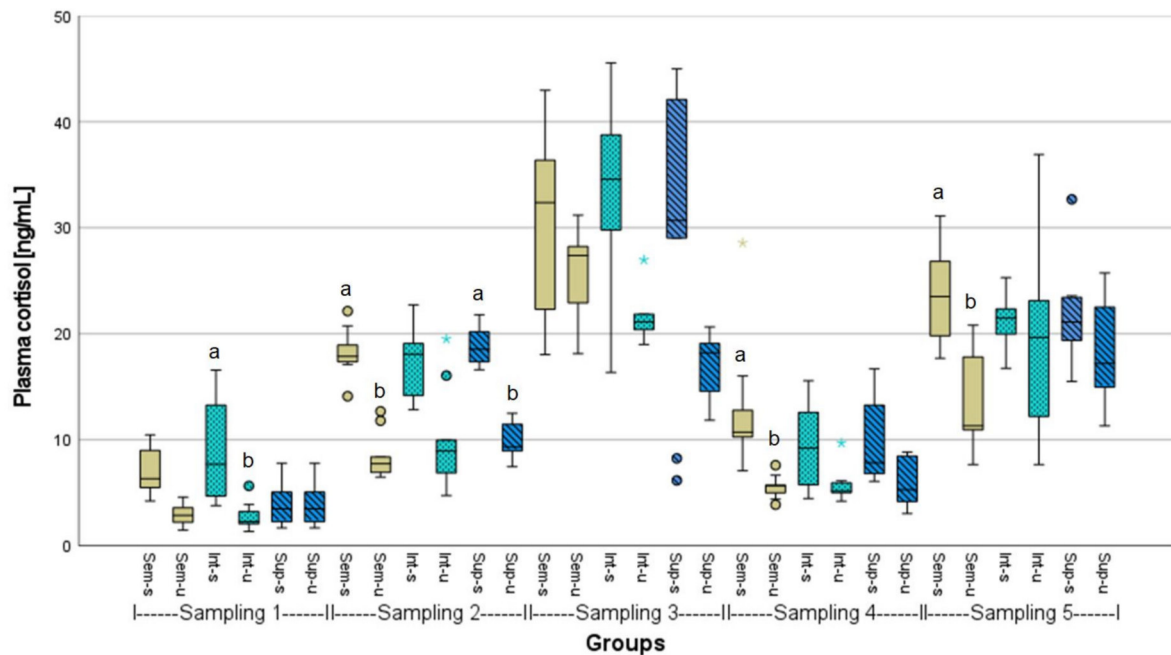


Figure 1. Plasma cortisol responses of stressed (s) or unstressed (u) African catfish ($n = 9$) under three different stocking densities (Sem = semi-intensive, Int = intensive, Sup = super-intensive). Kruskal-Wallis test with Tukey-HSD or Dunnnett-T3 post hoc test, significances ($p < 0.05$) are only given within the respective samplings, marked by letters. Circlets = outliers; asterisks = extreme values.

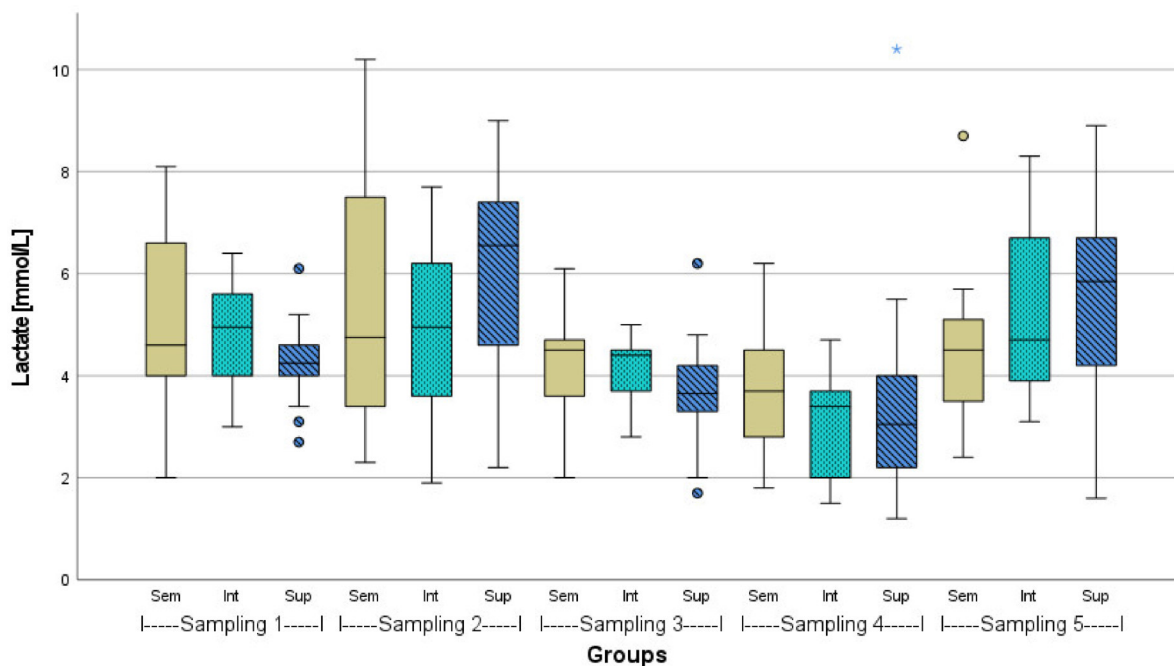


Figure 2. Lactate level of African catfish ($n = 18$) in three different stocking densities (Sem = semi-intensive, Int = intensive, Sup = super-intensive), $p > 0.05$. Circlets = outliers; asterisk = extreme value.



Figure 3. Skin lesions (bite marks) on an African catfish in the typical jaw form of this species as result of agonistic interactions. The photo was contrast-enhanced by 25%.

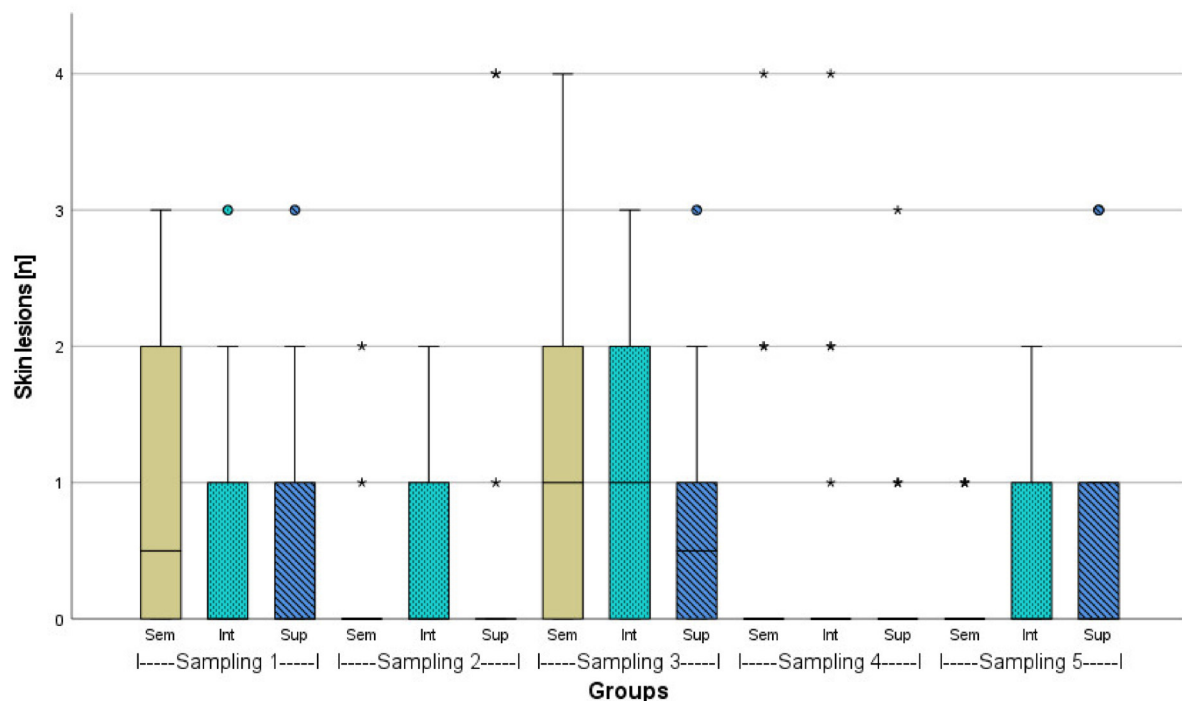


Figure 4. Number of external injuries (skin lesions) of African catfish ($n = 18$) in three different stocking densities (Sem = semi-intensive, Int = intensive, Sup = super-intensive), $p > 0.05$. In sampling 3, in Sem, a value of 6, and in Sup a value of 8 is not illustrated. Circlets = outliers; asterisks = extreme values.

Gene profiling focused on the third and fifth samplings, which were noticeable due to the high number of injured individuals. We hypothesized that skin lesions might entail not only stress, but also immune responses. Therefore, we quantified the transcript number of 22 selected genes in the spleen tissue of either unstressed or stressed African catfish kept under semi-intensive or super-intensive conditions (Figure 5). The spleen was chosen as the target tissue because it responds to both immune and stress-related stimuli. For instance, it has been well proven that the spleen stores red blood cells under stress conditions and/or during metabolic alterations.

The obtained qPCR data revealed a moderate impact on the level of the selected transcripts. At the third sampling, only *kmt2a* was slightly (1.2- to 1.3-fold, $p < 0.002$) downregulated in both unstressed and stressed African catfish kept under super-intensive versus semi-intensive conditions, and also in stressed versus unstressed individuals kept under both semi- and super-intensive conditions.

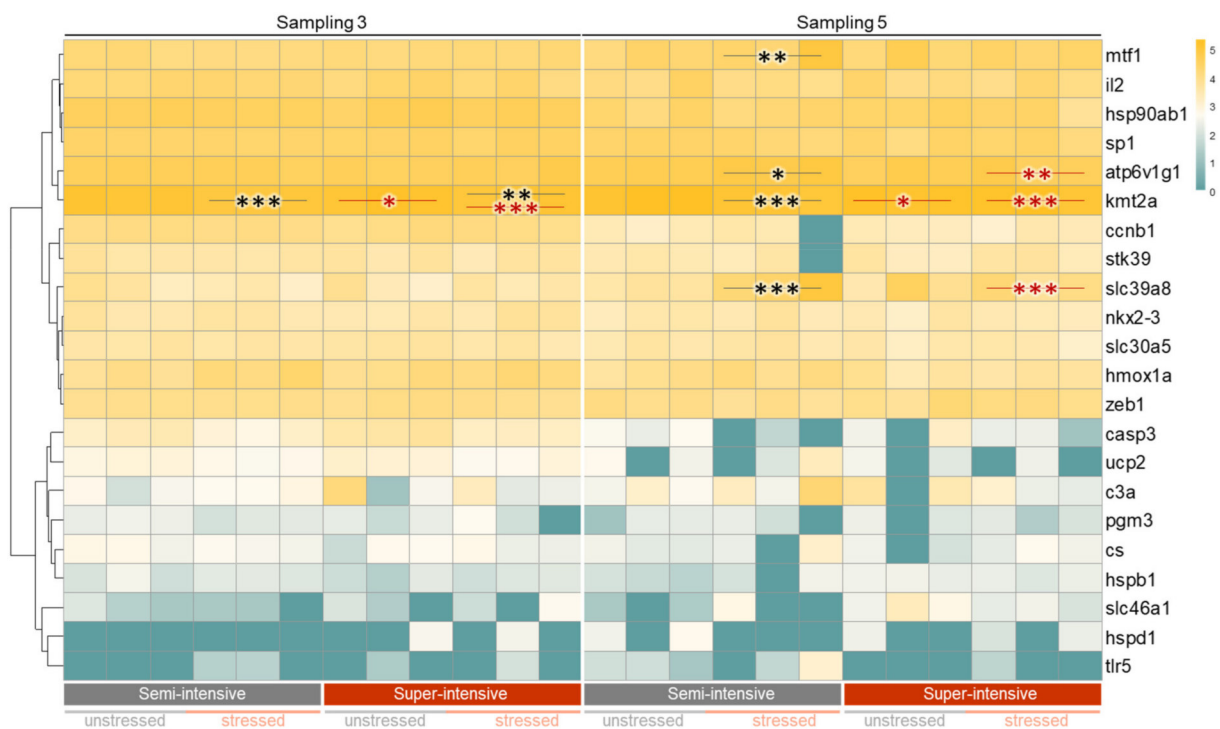


Figure 5. Hierarchical clustering of log10-transformed transcript numbers measured in the spleen of individual African catfish. The fish were kept under semi-intensive or super-intensive conditions, and individuals of both groups were exposed to stress, while a cohort remained unstressed (indicated below the heatmap). The sampling time points are indicated above the heatmap. The transcripts quantified are listed as gene symbols on the right margin; transcript levels are colored according to the scale on the left. Black asterisk(s) indicate a different expression in the stressed group compared to the matching unstressed group of the same stocking density and at the same sampling timepoint; red asterisk(s) indicate a different expression in the super-intensive group versus the semi-intensive group under the same conditions (either unstressed or stressed) and at the same sampling timepoint (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

At the fifth sampling, *kmt2a* was again differentially expressed between both unstressed and stressed African catfish kept under super-intensive versus semi-intensive conditions, and also in stressed versus unstressed individuals kept under semi-intensive conditions; however, in each case, the deviation was only between 1.1 and 1.5 (with $p < 0.03$). Similarly low (1.4- to 1.6-fold) but statistically significant ($p < 0.02$) were the deviations of the *atp6v1g1* levels between stressed versus unstressed African catfish kept under semi-intensive conditions and stressed individuals kept under super-intensive versus semi-intensive conditions.

In contrast, *slc39a8* was this study's most strongly regulated differentially expressed gene. In stressed African catfish kept under semi-intensive conditions, *slc39a8* was 9.7-fold down-regulated (with $p = 0.008$) compared to the unstressed cohort; in stressed individuals kept under super-intensive conditions, *slc39a8* was 3.9-fold up-regulated (with $p < 0.0001$) compared to the stressed catfish kept under semi-intensive conditions.

The levels of *mtf1* were moderately down-regulated by 2.2 (with $p = 0.008$) in stressed African catfish kept under semi-intensive conditions compared to unstressed fish. The transcript concentrations of the remaining 18 genes examined showed no significant alterations. Nevertheless, the 24-fold decrease in *casp3* transcripts (with $p > 0.05$) in stressed catfish kept under semi-intensive conditions compared to unstressed individuals may be worth mentioning.

4. Discussion

In the present study, the stocking density influenced the growth performance of African catfish under commercial rearing conditions. In addition, the effects of stocking density in relation to fish size, as well as external stress due to construction noise on different fish welfare indicators, were demonstrated.

In commercial RASs, African catfish can reach slaughter weight in about 6 months; in ponds, this may take longer [35]. The production time depends in particular on the water temperature and feed quality and quantity. In the present study, African catfish at all stocking densities reached appropriate slaughter weights after 23 weeks; 1 week earlier than expected. The water quality in the RAS was also found to provide suitable conditions for African catfish aquaculture without much potential to impair fish welfare. However, due to the very high stocking densities, this required an increased effort. Consequently, the cultivation conditions, as well as the growth performance, can be described as very good in each of the sampled groups.

Van de Nieuwegiessen et al. [28] indicated no growth difference between African catfish from different stocking densities (96.9–485.6 kg m⁻³) after the final growth phase from approx. 1000–1500 g fish⁻¹. In addition, partially contradictory findings have been reported. For instance, Toko et al. [36] described the influence of rather extensive stocking densities (4–8 fish m⁻³) on juvenile African catfish (approx. 35–150 g) in ponds, whereby growth performance significantly increased with increasing densities. However, other studies have reported lower growth with increasing densities in juveniles of approx. 30–100 g in tanks at 35–125 kg m⁻³ [37–39], or in pond cages at max. 63 kg m⁻³ [40]. According to Hecht and Appelbaum [41], particularly in early developmental stages (larvae) of African catfish, stocking density can have an impact on growth. Li et al. [42] pointed out the heterogeneity of studies regarding the effect of stocking densities on growth.

In the present study, the super-intensively stocked fish showed the weakest growth performance, significantly different to the growth performance of semi-intensively stocked fish, which was approx. 13% better. This was also visible when comparing the FCR or CI (Table 3, Figure A3). Consequently, this study comes to similar conclusions regarding the influence of stocking density on growth as several previous studies; it is the case, even in commercial-scale RAS culture, that African catfish tend to grow slightly less under high stocking densities than under extensive conditions. This clearly contradicts the study by van de Nieuwegiessen et al. [28].

Mortality or survival of African catfish, with respect to stocking density, has again been differently described. Van de Nieuwegiessen et al. [22] reported a mortality rate of 2.5% under aquarium conditions, regardless of stocking density. Akinwale and Faturoti [43] described a survival rate of 75–93% (conversely, 7–25% mortality) for different developmental stages in commercial RASs. Palm et al. [31] found survival rates of 96% for extensively (50 kg m⁻³) to 81% for intensively (200 kg m⁻³) stocked fish. In the present study, mortality was not directly correlated with the increase in stocking density. The highest mortality was found in a super-intensive density tank, while it was overall lower in intensive and semi-intensive densities. However, African catfish survival rates can vary between different tanks, possibly due to differences in group composition, a factor that is difficult to control. Based on our experience, we see a higher risk of a greater percentage of African catfish dying under higher stocking densities. Unfortunately, in the present study it was not possible to investigate at what time how many fish died at each stocking density because the carcasses were quickly eaten by conspecifics.

Boerrigter et al. [44] described the physiological stress-related indicators, plasma cortisol, glucose, and lactate, prior to and post stress in juveniles of African catfish (8–10 g). The basal levels (unstressed) for cortisol were at 6.5–15.3 ng mL⁻¹, for glucose at 3.7–5.4 mmol L⁻¹, and for lactate at 1.3–2.2 mmol L⁻¹, respectively. Directly, as well as 30 and 60 min after stressing, the fish plasma cortisol was at 12–48.5 ng mL⁻¹, glucose at 4.2–6.8 mmol L⁻¹, and lactate at 1.1–2.3 mmol L⁻¹, respectively. Martins et al. [45] described, in particular after stress induction, higher levels of more than 100 ng mL⁻¹

for plasma cortisol and up to 8 mmol L^{-1} for glucose. Manuel et al. [46] depicted basal levels of cortisol for adults of African catfish (1–1.5 kg) at $< 10 \text{ ng mL}^{-1}$; after handling, stress cortisol increased to 35 ng mL^{-1} , and after 3-h transportation to 50 ng mL^{-1} . These authors reported plasma glucose between approx. $3.5\text{--}6.5 \text{ mmol L}^{-1}$, with only minor elevations after stress induction. Van de Nieuwegiessen et al. [28] reported basal lactate levels in adult African catfish (1–1.5 kg) with approx. 3 mmol L^{-1} , and elevated levels of $3.6\text{--}4.9 \text{ mmol L}^{-1}$ after stress.

In the present study, the mean plasma cortisol and glucose levels of fish from each stocking density were in comparable ranges. Significant or at least trended differences with about two-fold elevated cortisol levels were frequently found between stressed and unstressed fish within one sampling. Both the basal levels and the elevations of cortisol due to induced stress were considered regular, according to the observations of Boerrigter et al. [44]; thus, the different stocking densities had at least no effect on this stress indicator. This is in contrast to the findings of van de Nieuwegiessen et al. [22], according to which an impaired cortisol response was observed under the lowest and highest stocking densities, and a down-regulation of ACTH or a depletion of the cortisol receptors due to chronic stress was suspected.

The overall glucose level can be considered relatively high in the measured ranges, but we assume that this could also be related to feeding, as earlier described by Polakof et al. [47]. In fact, feeding in our experiment was aimed at promoting excellent growth, which was achieved. In addition, we detected significant increases due to induced (acute) stress compared to basal levels, and no differences between semi-intensively and super-intensively stocked fish, suggesting feeding was the reason for an overall high glucose level. The mean lactate values were still within the normal range, albeit some fish had slightly elevated values compared to the abovementioned references. The induced stress was inappropriate to affect lactate levels because no physical activity or hypoxic stress was imposed by it. Lactate, as a gluconeogenic precursor, is directly related to blood glucose (also elevated) and generally increases with increased physical activity and/or oxygen deficiency. Both may have occurred under the high stocking densities tested.

The number of skin lesions on African catfish has been recorded in several studies [22,28,32,48–50]. The number largely varied between 0–5 per fish, depending on developmental stage and group composition. Studies addressing the area of skin lesions in African catfish are not known to the authors to date. In the present study, both the stocking densities and the respective developmental stage/fish size were relevant for the number and area of skin lesions. While early juveniles under semi-intensive stocking density had twice as many skin lesions on average as under intensive or super-intensive stocking density, it was reversed towards the end of the production period. Here, the matured fish under semi-intensive stocking densities showed very few skin lesions, while the number and area of bite wounds remained similar under intensive and super-intensive stocking densities. In any case, the occurrence of skin lesions may impair welfare. If possible, this should be considered for the different growth stages, also with regard to their current stocking density [51]. This behavioral change was already evident from other studies. According to Kaiser et al. [52] and van de Nieuwegiessen et al. [22], juvenile African catfish frequently show agonistic interactions, particularly under low stocking densities. This decreases under higher densities where the fish form “dense clusters [. . .] with constant movement and low aggression” [22] (p. 241). Information on adult African catfish is scarce, particularly at intensive or super-intensive stocking densities of commercial facilities. However, there is evidence that overall aggression decreases, resulting in fewer skin lesions [22,28].

Van de Nieuwegiessen et al. [22] described that skin problems and consequently infections might increase at stocking densities above 300 kg m^{-3} . Similar findings could not be generally confirmed in our study. However, a few fish in fact had to be removed from the super-intensive stocking density due to very severe and partially infected skin lesions.

The recording of somatic indices and the quantification of metabolic parameters of African catfish was complemented by gene-expression analysis to simultaneously quantify

22 genes associated with metabolism, immunity, and stress physiology. The transcript concentrations of most of these genes slightly changed or did not change significantly across the groups investigated, except for two genes. Both *slc39a8* and *mtf1* were significantly at least two-fold down-regulated in stressed African catfish kept under semi-intensive conditions compared to the unstressed fish. *Mtf1* encodes a transcription factor that is involved in cellular adaptation to a range of stress conditions [53]. *Slc39a8* codes for a transporter-like protein that maintains zinc homeostasis [54] and regulates cell migration [55]. It would be highly speculative to suggest possible functions of both gene products in African catfish, but the reduced levels of both *mtf1* and *slc39a8* might indicate an impending maladaptation of African catfish to adverse conditions. Previous single-gene expression analyses indicated few transcriptional parameters that could serve as potential indicator genes of stress responses in *Clarias* sp. [56,57]. The present study adds *mtf1* and *slc39a8* to the list of potential indicator genes that might be included in future studies on the welfare of African catfish.

Coppola et al. [58] described the noise as a physical stressor on animals leading to physiological, behavioral, and anatomical responses. It is well-known that anthropogenic noise affects many species [59]. Anthropogenic noise, which may include the background and partly loud noises of a mechanized aquaculture system, as well as other anthropogenic noise impacts (including construction and demolition noise), can negatively affect fish behavior, health, and welfare [60–62]. This presupposes that acoustic waves are transmitted from air into water. In the second phase of the experiment, particularly during the time of the third sampling, all treatment groups showed an increase in plasma cortisol and glucose levels, with noticeably larger interquartile ranges and upper Whiskers, slightly flattened lactate levels, and a larger number of skin lesions (including an increase in injured surface area), indicating that the fish were generally affected or stressed. Apparently, endogenous stress responses occurred more frequently in this second phase under noise exposure. The tentatively decreased lactate levels may indicate altered behavior, such as a reduction in swimming activity. At the same time, the African catfish reacted more aggressively, as evidenced by the increased incidence of skin lesions. Most likely, the demolition noise raised the stress levels in the African catfish and led to behavioral alterations. Therefore, it is recommended that external stressors in aquaculture, including loud noises, need to be avoided, especially if they persist for an extended period, preventing a chronic stress situation for the fish. It could have negative consequences for their wellbeing, health, and growth.

5. Conclusions

The growth of African catfish was very high at all stocking densities. However, at the end of the experiment, the semi-intensively stocked fish had significantly higher weights (by about 13%) than the super-intensively stocked fish. This study further demonstrates that particularly for early juvenile life stages of African catfish, intensive or super-intensive stocking density, whereas for matured fish, semi-intensive stocking density results in less aggression and fewer skin lesions. In addition, the fish welfare investigation revealed evidence of the influence of the demolition noise that occurred. We therefore suggest an adaptation of stocking density during the growth phases of African catfish after size-grading and the avoidance of external stressors in aquaculture to enhance production efficiency and fish welfare.

Author Contributions: Conceptualization, B.B. and L.C.W.; methodology, B.B.; validation, B.B.; formal analysis, B.B., A.R. and M.-C.H.; investigation, B.B., L.H., A.R., L.C.W., M.-C.H. and M.V.; resources, B.B. and L.C.W.; data curation, B.B., L.H., A.R. and M.V.; writing—original draft preparation, B.B.; writing—review and editing, B.B., A.R., L.C.W., M.-C.H., M.V. and H.W.P.; visualization, B.B. and A.R.; supervision, H.W.P.; project administration, B.B.; funding acquisition, H.W.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the project “Performance and process water management in commercial (integrated) aquaculture systems with African catfish (*Clarias gariepinus*) in Mecklenburg-Western Pomerania” (MV-II.1-LM-007: 139030000103, EMFF: 7302).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the relevant Ethics Committee of the “Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern” (LALLF MV, approval number: 7221.3-1-042/20, date of approval: August 20, 2020).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on a reasonable request from the corresponding author. The data are not publicly available.

Acknowledgments: We thank Ulrich Knaus for project coordination and supporting with materials and feeds. We thank Philipp Sandmann, Ronja Siebert, Julian Bertram, and Tim Fuhrmann for their support with system maintenance and assistance during samplings (University of Rostock). We thank Ingrid Hennings, Brigitte Schöpel, and Franziska Witt for their excellent technical assistance (FBN, Dummerstorf).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Appendix A

Table A1. Oligonucleotide-primer sequences derived from *Clarias gariepinus*, *Ictalurus punctatus*, or *Pangasianodon hypophthalmus*.

Gene Symbol	Gene Product	Function	Sense Primer (5'→3'), Antisense Primer (5'→3')	Source (Species; Accession Code)	Amplicon Length (bp)
Reference genes:					
<i>rna18s</i>	18S ribosomal RNA	Structure of eukaryotic ribosomes	CTCTGCTGGACGATGGCTTAC, TCGATGAAGAACGCAGCCAGC	<i>C. gariepinus</i> ; GQ465239	94
<i>actb</i>	Actin-beta	Cell structure and motility, intercellular signalling	ACCACCACAGCCGAGAGAGAA, CTTCCAGCCATCTTTCCTTGGT	<i>C. gariepinus</i> ; EU527191	204
<i>gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Carbohydrate metabolism	TATGAAGCCCGCTGAGATCCC, GCCTCTTCTCACTGCAGGGT	<i>C. gariepinus</i> ; AF323693	106
<i>rpl</i>	Ribosomal protein, large subunit	Structure of eukaryotic ribosomes	ACTAAATAGCAACTGATCCCTATC, GAATATCTGACCACTAAGATCCG	<i>C. gariepinus</i> ; MW080924	134
Target genes:					
<i>atp6v1g1</i>	ATPase H ⁺ transporting v1 subunit g1	Intercellular Fe homeostasis	CGGAAAAACCGCCGCTTGAAG, GACCAAGGAAGCCGCGGCAC	<i>P. hypophthalmus</i> ; XM_026922532	106
<i>c3a</i>	Complement component 3, variant a	Bacteria opsonisation and destruction	ATGTCTTTTCGATGTCACGGTTTAT, TCGAACCAAGAGTAACGGCATG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017457024	114
<i>casp3</i>	Caspase 3	Apoptosis	CTCTTTATCAITCAGGCTTGTCG, GTACTCTACTGCTCCAGGTTATT	<i>I. punctatus</i> ; XM_017473312	139
<i>ccnb1</i>	Cyclin b1	Control of the G2/M transition phase of the cell cycle	TCAAAAATCGGAGAGGTTACAGC, TGCACTTGTCTCCCTCTCTGG	<i>I. punctatus</i> ; NC_030443	103
<i>cs</i>	Citrate synthase	Aerobic metabolism	GGTGGTGAAGTGTCCGATGAAA, GCTATGGGCATGCTGTCTCTGA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017487510	94
<i>hmox1a</i>	Heme oxygenase 1	Cellular response to xenobiotic stimulus	GATTCTTCTGTGTTCCCTGTATG, CCATCTACTTCCCTCAGGAGC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017491622	104
<i>hsp90ab1</i>	Heat-shock protein 90 alpha family class b member 1	Chaperone function, stress response	GAACATCAAGCTGGGCATCCAT, TTACTACATCACTGGTGAGAGCA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017456214	167
<i>hspb1</i>	Heat-shock protein family b (small) member 1	Differentiation of cell types, stress response	ACAGGACAACCTGGAAGGTGAAC, GATTATCGGAAACCATGAGGAGA	<i>Clarias batrachus</i> ; KT359728	107
<i>hspd1</i>	Heat shock protein family d (hsp60) member 1	Chaperone function, stress response	GCACGCTTGTCTCAACAGGTT, AGACATGGCGATTGCTACTGGA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017469365	113
<i>il2</i>	Interleukin-2	Activation and proliferation of lymphocytes	GTGCGCTGGGAAAAAGCCAAAT, TTATGTGTTTGCACCAGACAACG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017474923	162
<i>kmt2a</i>	Lysine-specific methyltransferase 2a	Regulation of early development and hematopoiesis	ATTGGGTCGAAATCGTGCTGTAT, ATGATAAGTCTTCAGTGGCAGGT	<i>I. punctatus</i> ; XM_017490460	121
<i>mtf1</i>	Metal regulatory transcription factor 1	Catabolic regulation of cartilages	GTAGGAGGGCAATCAGGGAAC, AGTCAGAACGCTGCCCCCTC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017475296	146
<i>nkx2-3</i>	NK2 homeobox 3	Cell differentiation	TACAGGACAACCTGGTGAAAG, ACAACCTCTTGGTTTCTGCTCTT	<i>I. punctatus</i> ; XM_017464595	119
<i>pgm3</i>	Phosphoglucomutase 3	Carbohydrate metabolism	GACACAGGCAGGGCTGAATCT, CTTCGTACAGCACACTGTAACC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017494096	112
<i>slc30a5</i>	Solute carrier family 30, member 5	Zinc transportation	AATAGTCAACCAAAAGACAGTGGAT, CATCGTTGTGCTCGAACAACAG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017459891	134
<i>slc39a8</i>	Solute carrier family 39, member 8 alias ZIP8	Cellular zinc uptake, protection from inflammation-related injury and death	TTTAACCTGATCTCAGCCATGTC, TATGTTCCCTGAGATGAATGCCA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017489708	151

Table A1. Cont.

Gene Symbol	Gene Product	Function	Sense Primer (5'→3'), Antisense Primer (5'→3')	Source (Species; Accession Code)	Amplicon Length (bp)
<i>slc46a1</i>	Solute carrier family 46, member 1	Folate transportation	AATGGCGACATGCACAAGGGTAT, AGAACAGCCTTGCCCCAGGG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017491375	129
<i>sp1</i>	SP1 transcription factor	Cell growth, apoptosis, differentiation and immune responses	AGCACAGCAGGTGATCAGGGA, GAGAAGCGTGACATGTCCATA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017450095	119
<i>stk39</i>	Serine/threonine kinase 39	Stress response	TGTAGTTGTGCTGCTAACCTTC, AGATCCCTGACGAGGTGAAGC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017469076	116
<i>tlr5</i>	Toll-like receptor 5	Detection of bacteria	GGCAGCATGGGAAAGGGAGTT, GTAAAGCTCTGGATCTGTCCA	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200229	103
<i>ucp2</i>	Uncoupling protein 2	Regulation of production of reactive oxygen species, function of mitochondria	GGCTCCAGATCCAAGGGGAGA, CCACGTAGTCTCTACAACGGG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017489367	131
<i>zeb1</i>	Zinc finger e-box binding homeobox 1	Repression of interleukin-2 function	GCAGAGACCAGCGGCATGTAA, ATACGAGTGCCCCAACTGTAAAA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017483097	156

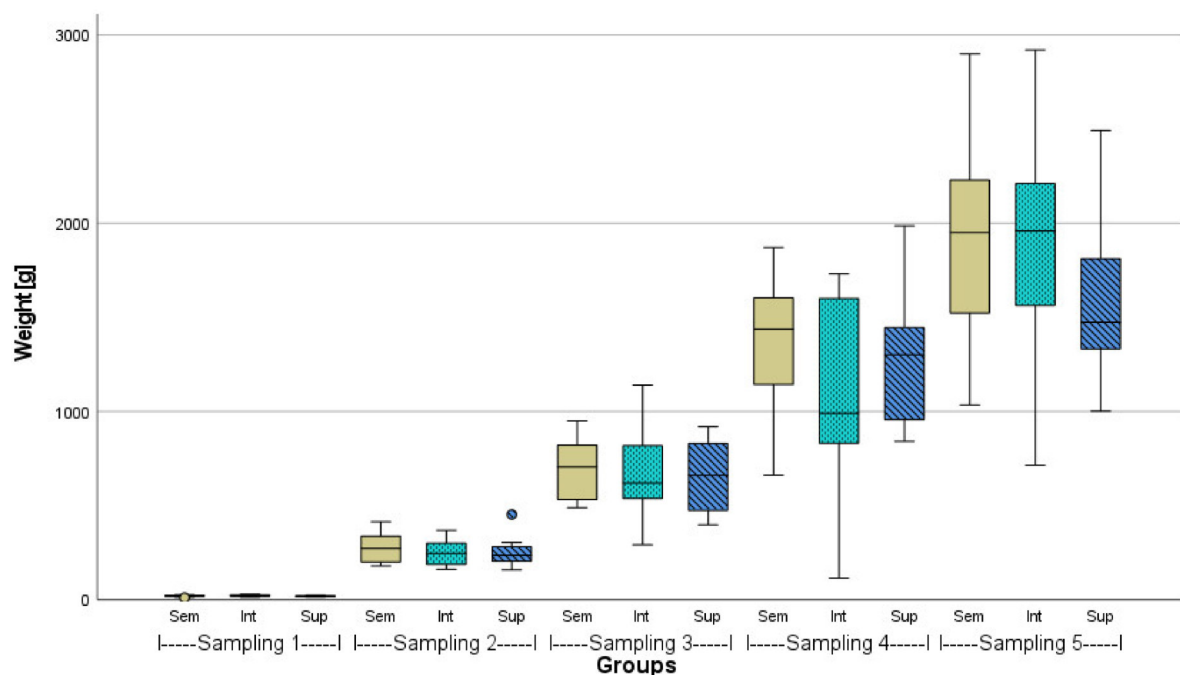


Figure A1. Weight gain of African catfish from three different stocking densities (Sem = semi-intensive, Int = intensive, Sup = super-intensive) over 23 weeks, $n = 18$, $p > 0.05$ in respective samplings. Circlet = outlier.

Table A2. Cortisol: Relevant significances within a single sampling between unstressed and stressed fish in a treatment group, and between unstressed or stressed fish in a treatment group between different samplings. Sem = semi-intensive; Int = intensive; Sup = super-intensive; the number before the stocking density abbreviation indicates the respective sampling; u = unstressed, s = stressed.

Group Comparison	p-Value	Group Comparison	p-Value	Group Comparison	p-Value
Within a sampling		Within a sampling		Within a sampling	
2Sem-u-2Sem-s	0.022	1Int-u-1Int-s	0.047	2Sup-u-2Sup-s	0.038
4Sem-u-4Sem-s	0.043	Between samplings		Between samplings	
5Sem-u-5Sem-s	0.032	1Int-u-2Int-u	0.021	1Sup-u-2Sup-u	0.040
Between samplings		1Int-s-2Int-s	0.026	1Sup-s-2Sup-s	0.000
1Sem-u-2Sem-u	0.042	1Int-u-3Int-u	0.000	1Sup-u-3Sup-u	0.000
1Sem-s-2Sem-s	0.006	1Int-s-3Int-s	0.000	1Sup-s-3Sup-s	0.000
1Sem-u-3Sem-u	0.000	1Inti-u-5Int-u	0.000	1Sup-s-4Sup-s	0.049
1Sem-s-3Sem-s	0.000	2Int-u-3Int-u	0.003	1Sup-u-5Sup-u	0.000
1Sem-u-5Sem-u	0.001	2Int-u-5Int-u	0.043	1Sup-s-5Sup-s	0.000
1Sem-s-5Sem-s	0.000	4Int-s-2Int-s	0.048	4Sup-s-2Sup-s	0.031

Table A2. Cont.

Group Comparison	<i>p</i> -Value	Group Comparison	<i>p</i> -Value	Group Comparison	<i>p</i> -Value
2Sem-u-3Sem-u	0.000	4Int-u-3Int-u	0.000	4Sup-u-3Sup-u	0.002
4Sem-u-3Sem-u	0.000	4Int-s-3Int-s	0.000	4Sup-s-3Sup-s	0.002
4Sem-s-3Sem-s	0.004	4Int-u-5Int-u	0.001	4Sup-u-5Sup-u	0.001
4Sem-u-5Sem-u	0.018	4Int-s-5Int-s	0.004	4Sup-s-5Sup-s	0.008
4Sem-s-5Sem-s	0.013				
5Sem-u-3Sem-u	0.021				

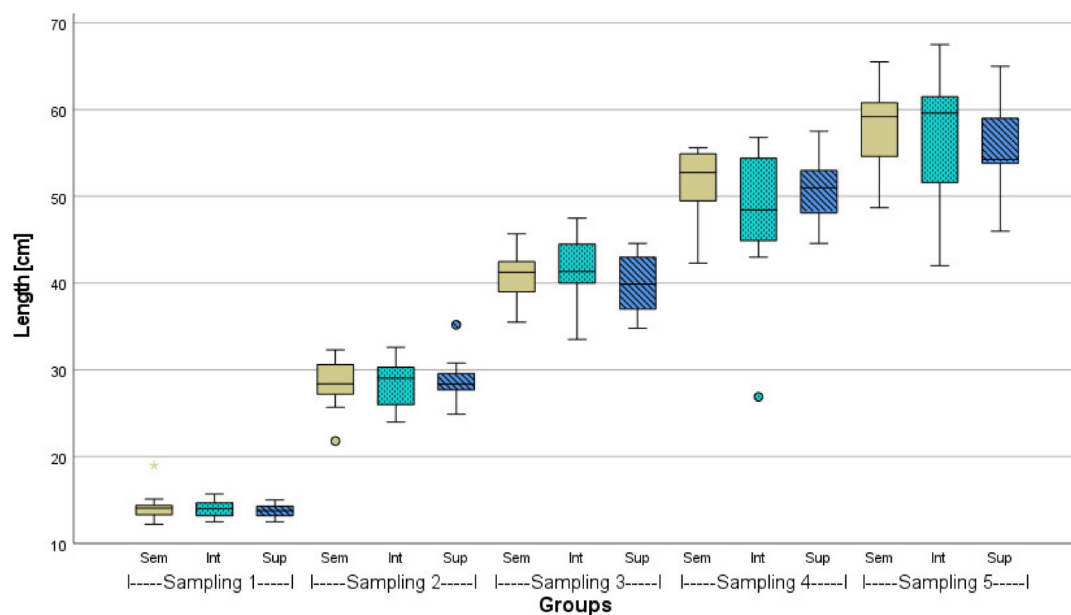


Figure A2. Total body length of African catfish from three different stocking densities (Sem = semi-intensive, Int = intensive, Sup = super-intensive) over 23 weeks, $n = 18$, $p > 0.05$ in respective samplings. Circlets = outliers, asterisk = extreme value.

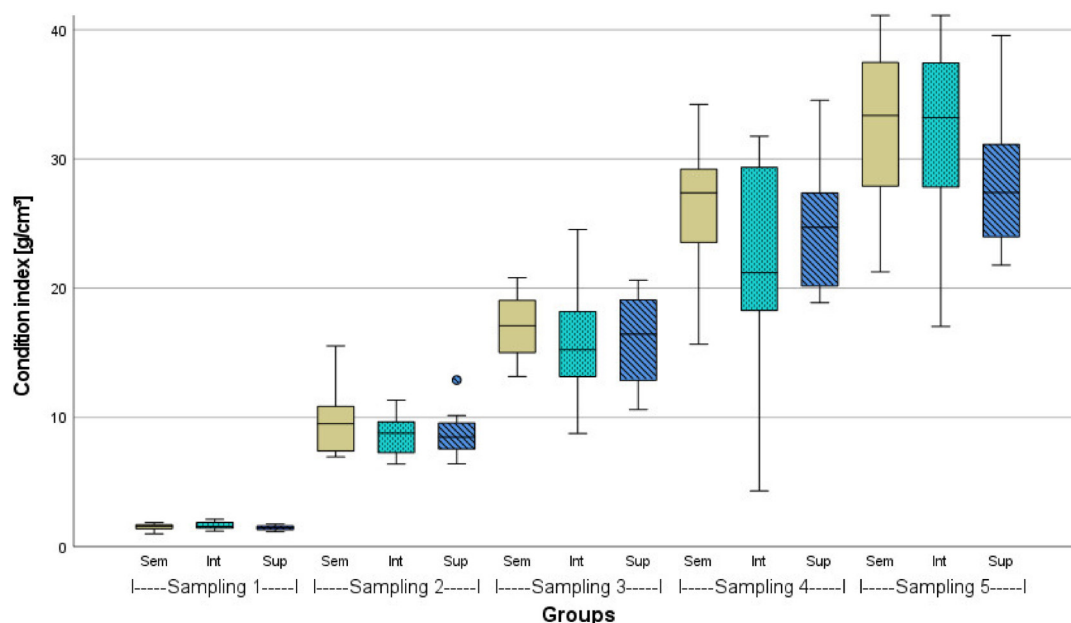


Figure A3. Condition indices of African catfish from three different stocking densities (Sem = semi-intensive, Int = intensive, Sup = super-intensive) over 23 weeks, $n = 18$, $p > 0.05$ in respective samplings. Circlet = outlier.

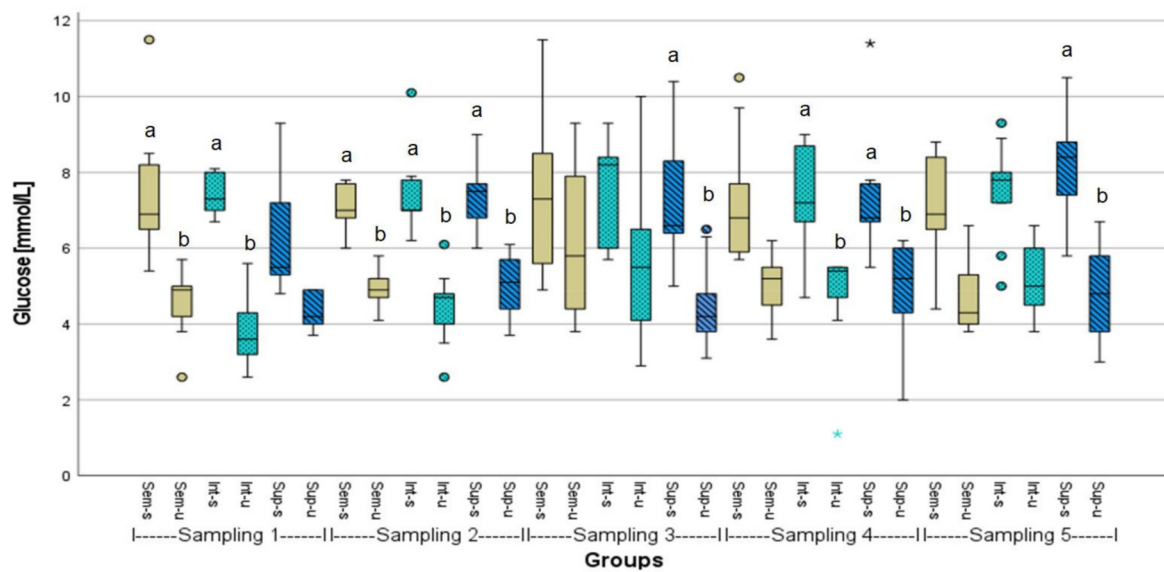


Figure A4. Glucose levels of stressed (s) or unstressed (u) African catfish ($n = 9$) under three different stocking densities (Sem = semi-intensive, Int = intensive, Sup = super-intensive). Kruskal-Wallis test with Tukey-HSD or Dunnett-T3 post hoc test, significances ($p < 0.05$) are only given within the respective samplings, marked by letters. Circlets = outliers; asterisks = extreme values.

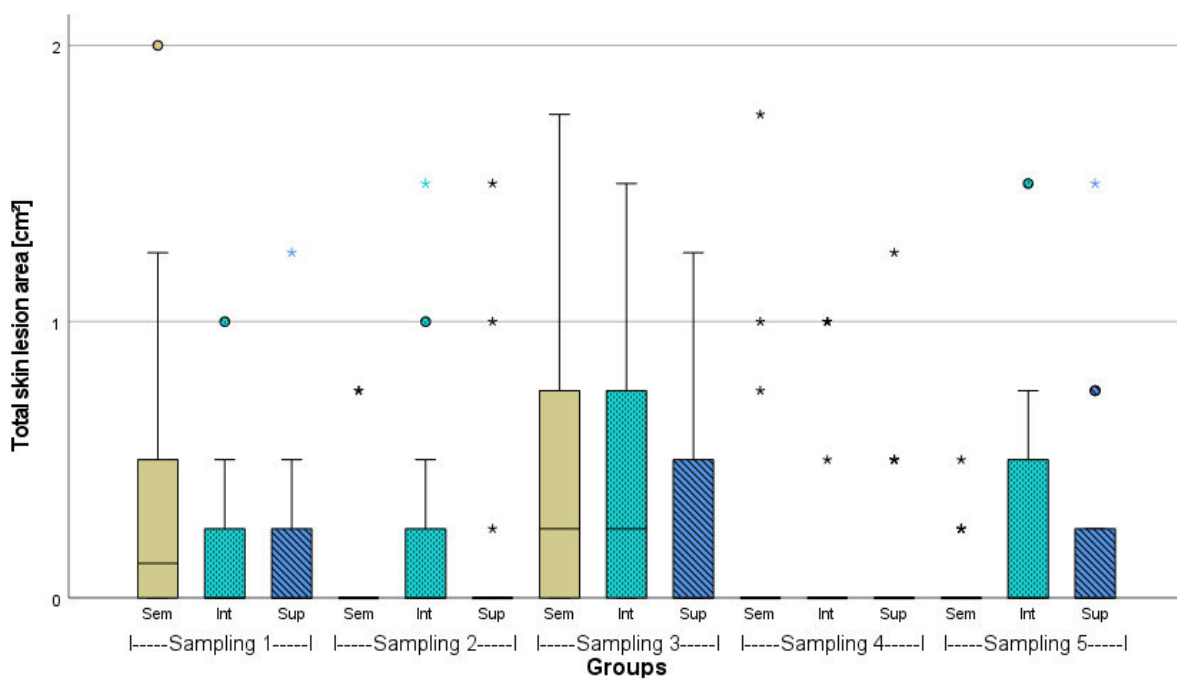


Figure A5. Total skin lesion area of African catfish in three different stocking densities (Sem = semi-intensive, Int = intensive, Sup = super-intensive), $n = 18$, $p > 0.05$. In sampling 3, in Sem, a value of 3, and in Sup a value of 4 is not illustrated. Circlets = outliers; asterisks = extreme values.

References

- Montero, D.; Izquierdo, M.S.; Tort, L.; Robaina, L.; Vergara, J.M. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* **1999**, *20*, 53–60. [CrossRef]
- Ellis, T.; North, B.; Scott, A.P.; Bromage, N.R.; Porter, M.; Gadd, D. The relationships between density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.* **2002**, *61*, 493–531. [CrossRef]
- Carbonara, P.; Alfonso, S.; Gai, F.; Gasco, L.; Palmegiano, G.; Spedicato, M.T.; Zupa, W.; Lembo, G. Moderate stocking density does not influence the behavioural and physiological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in organic aquaculture. *Aquac. Res.* **2020**, *51*, 3007–3016. [CrossRef]
- Conte, F.S. Stress and the welfare of cultured fish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2004**, *86*, 205–223. [CrossRef]
- Ashley, P.J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2007**, *104*, 199–235. [CrossRef]
- Baldwin, L. The effects of stocking density on fish welfare. *Phym. Stud. Sci.* **2011**, *4*, 372–383.
- Oké, V.; Goosen, N.J. The effect of stocking density on profitability of African catfish (*Clarias gariepinus*) culture in extensive pond systems. *Aquaculture* **2019**, *507*, 385–392. [CrossRef]
- Ferreira, H.; Ramalho Ribeiro, A.; Dias, J.; Yúfera, M.; Arias, A.M.; Falcão, M.; Serpa, D.; Aires, T.; Pousão-Ferreira, P.; Cunha, M.E.; et al. Sustainable semi-intensive polyculture of seabream and sole in earthen ponds. *Aquac. Eur.* **2010**, *35*, 17–21.
- Lymbery, P. In Too Deep the Welfare of Intensively Farmed Fish. A Report for Compassion in World Farming Trust. 2002. Available online: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=0adba50d39fb67867286eed5f52c7c2ccb586d62> (accessed on 23 January 2023).
- Naylor, R.L.; Hardy, R.W.; Buschmann, A.H.; Bush, S.R.; Cao, L.; Klinger, D.H.; Little, D.C.; Lubchenco, J.; Shumway, S.E.; Troell, M. A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature* **2021**, *591*, 551–563. [CrossRef]
- Ortuno, J.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish Shelf. Immunol.* **2001**, *11*, 187–197. [CrossRef]
- North, B.P.; Turnbull, J.F.; Ellis, T.; Porter, M.J.; Migaud, H.; Bron, J.; Bromage, N.R. The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **2006**, *255*, 466–479. [CrossRef]
- Yarhamadi, P.; Miandare, H.K.; Fayaz, S.; Caipang, C.M.A. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress-and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shelf. Immunol.* **2016**, *48*, 43–53. [CrossRef] [PubMed]
- Farhaduzzaman, A.M.; Hanif, A.; Khan, S.; Osman, M.H.; Shovon, N.H.; Rahman, M.K. Perfect Stocking Density Ensures Best Production and Economic Returns in Floating Cage Aquaculture System. *J. Aquac. Res. Dev.* **2020**, *11*, 1–7. [CrossRef]
- Debnath, D.; Das, B.K.; Yengkokpam, S.; Das, P.; Yadav, A.K.; Sharma, N.; Borah, S.; Ray, B.C.; Kakati, A.; Sarkar, U.K.; et al. Evaluating growth, production and economics of a new candidate species *Labeo bata* in cages: A regional model for table fish production in floodplain wetlands of North East India. *Aquaculture* **2022**, *546*, 737344. [CrossRef]
- Destatis, Statistisches Bundesamt. Land und Forstwirtschaft, Fischerei. Erzeugung in Aquakulturbetrieben 2012. Available online: https://www.statistischebibliothek.de/mir/servlets/MCRFileNodeServlet/DEHeft_derivate_00009985/2030460127004.pdf (accessed on 16 November 2022).
- Destatis, Statistisches Bundesamt. Land und Forstwirtschaft, Fischerei. Erzeugung in Aquakulturbetrieben 2020. Available online: https://www.statistischebibliothek.de/mir/servlets/MCRFileNodeServlet/DEHeft_derivate_00061752/2030460207004.pdf (accessed on 16 November 2022).
- Dauda, A.B.; Natrah, I.; Karim, M.; Kamarudin, M.S.; Bichi, A. African catfish aquaculture in Malaysia and Nigeria: Status, trends and prospects. *Fish. Aquac. J.* **2018**, *9*, 1–5. [CrossRef]
- Roques, J.A.; Schram, E.; Spanings, T.; van Schaik, T.; Abbink, W.; Boerrigter, J.; de Vries, P.; van de Vis, H.; Flik, G. The impact of elevated water nitrite concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquac. Res.* **2015**, *46*, 1384–1395. [CrossRef]
- Păpuc, T.; Petrescu-Mag, I.V.; Gavriloaie, C.; Botha, M.; Kovacs, E.; Coroian, C.O. Swimming in the mud—a short review of environmental parameter ranges tolerated by *Clarias gariepinus*. *Extreme Life Biospeol. Astrobiol.* **2019**, *11*, 9–17.
- Belão, T.C.; Leite, C.A.C.; Florindo, L.H.; Kalinin, A.L.; Rantin, F.T. Cardiorespiratory responses to hypoxia in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), an air-breathing fish. *J. Comp. Physiol. B* **2011**, *181*, 905–916. [CrossRef] [PubMed]
- Van de Nieuwegiessen, P.G.; Boerlage, A.S.; Verreth, J.A.; Schrama, J.W. Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2008**, *115*, 233–243. [CrossRef]
- Schram, E.; van der Heul, J.W.; Kamstra, A.; Verdegem, M.C.J. Stocking density-dependent growth of Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture* **2006**, *252*, 339–347. [CrossRef]
- Liu, B.; Liu, Y.; Sun, G. Effects of stocking density on growth performance and welfare-related physiological parameters of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in recirculating aquaculture system. *Aquac. Res.* **2017**, *48*, 2133–2144. [CrossRef]
- Refaey, M.M.; Li, D.; Tian, X.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Li, L.; Tang, R. High stocking density alters growth performance, blood biochemistry, intestinal histology, and muscle quality of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* **2018**, *492*, 73–81. [CrossRef]
- Long, L.; Zhang, H.; Ni, Q.; Liu, H.; Wu, F.; Wang, X. Effects of stocking density on growth, stress, and immune responses of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in a recirculating aquaculture system. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2019**, *219*, 25–34. [CrossRef] [PubMed]

27. Oyarzún, R.; Paredes, R.; Saravia, J.; Morera, F.J.; Muñoz, J.L.P.; Ruiz-Jarabo, I.; Mancera, J.M.; Vargas-Chacoff, L. Stocking density affects the growth performance, intermediary metabolism, osmoregulation, and response to stress in Patagonian blennie *Eleginops maclovinus*. *Aquaculture* **2020**, *515*, 734565. [CrossRef]
28. Van de Nieuwegiessen, P.G.; Olwo, J.; Khong, S.; Verreth, J.A.; Schrama, J.W. Effects of age and stocking density on the welfare of African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. *Aquaculture* **2009**, *288*, 69–75. [CrossRef]
29. Wendelaar Bonga, S.E. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* **1997**, *77*, 591–625. [CrossRef]
30. Wenzel, L.C.; Berchtold, E.; Palm, H.W. Effects of stocking density and grading on behaviour, cannibalism and performance of African catfish (*Clarias gariepinus*) fry. *Aquac. Rep.* **2022**, *27*, 101400. [CrossRef]
31. Palm, H.W.; Knaus, U.; Wasenitz, B.; Bischoff, A.A.; Strauch, S.M. Proportional up scaling of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) commercial recirculating aquaculture systems disproportionally affects nutrient dynamics. *Aquaculture* **2018**, *491*, 155–168. [CrossRef]
32. Martins, C.I.; Schrama, J.W.; Verreth, J.A. The effect of group composition on the welfare of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Appl. Anim. Behav. Sc.* **2006**, *97*, 323–334. [CrossRef]
33. Haufe, Handwerker auf Baustellen sind unterschiedlicher Lärmbelastung Ausgesetzt. Available online: https://www.haufe.de/arbeitsschutz/sicherheit/laermbelastung-auf-baustellen_96_156758.html (accessed on 15 February 2022).
34. Hildebrand, M.-C.; Rebl, A.; Nguinkal, J.A.; Palm, H.W.; Baßmann, B. Effects of Fe-DTPA on Health and Welfare of the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Water* **2023**, *15*, 299. [CrossRef]
35. Hecht, T. A review of on-farm feed management practices for North African catfish (*Clarias gariepinus*) in sub-Saharan Africa. In *On-Farm Feeding and Feed Management in Aquaculture*; FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No., 583; Hasan, M.R., New, M.B., Eds.; FAO: Rome, Italy, 2013; pp. 463–479.
36. Toko, I.; Fiogbe, E.D.; Koukpode, B.; Kestemont, P. Rearing of African catfish (*Clarias gariepinus*) and vundu catfish (*Heterobranchius longifilis*) in traditional fish ponds (whedos): Effect of stocking density on growth, production and body composition. *Aquaculture* **2007**, *262*, 65–72. [CrossRef]
37. Dai, W.; Wang, X.; Guo, Y.; Wang, Q.; Ma, J. Growth performance, hematological and biochemical responses of African catfish (*Clarias gariepinus*) reared at different stocking densities. *Afr. J. Agric. Res.* **2011**, *6*, 6177–6182. [CrossRef]
38. Wang, X.; Dai, W.; Xu, M.; Pan, B.; Li, X.; Chen, Y. Effects of stocking density on growth, nonspecific immune response, and antioxidant status in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Isr. J. Aquac. Bamidgah* **2013**, *65*, 1–6.
39. Wang, X.M.; Gao, J.W.; Xu, M.; Mo, B.L.; Dai, W.; Chen, C.H. Responses of growth rates and growth hormone levels of African catfish (*Clarias gariepinus*) to stocking density. *Iran. J. Fish. Sci.* **2017**, *16*, 698–710.
40. Hengsawat, K.; Ward, F.J.; Jaruratjamorn, P. The effect of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) cultured in cages. *Aquaculture* **1997**, *152*, 67–76. [CrossRef]
41. Hecht, T.; Appelbaum, S. Notes on the growth of Israeli sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) during the primary nursing phase. *Aquaculture* **1987**, *63*, 195–204. [CrossRef]
42. Li, L.; Shen, Y.; Yang, W.; Xu, X.; Li, J. Effect of different stocking densities on fish growth performance: A meta-analysis. *Aquaculture* **2021**, *544*, 737152. [CrossRef]
43. Akinwale, A.O.; Faturoti, E.O. Biological performance of African Catfish (*Clarias gariepinus*) cultured in recirculating system in Ibadan. *Aquac. Eng.* **2007**, *36*, 18–23. [CrossRef]
44. Boerrigter, J.G.; van den Bos, R.; van de Vis, H.; Spanings, T.; Flik, G. Effects of density, PVC-tubes and feeding time on growth, stress and aggression in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquac. Res.* **2016**, *47*, 2553–2568. [CrossRef]
45. Martins, C.I.; Schrama, J.W.; Verreth, J.A. The relationship between individual differences in feed efficiency and stress response in African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* **2006**, *256*, 588–595. [CrossRef]
46. Manuel, R.; Boerrigter, J.; Roques, J.; van der Heul, J.; van den Bos, R.; Flik, G.; van de Vis, H. Stress in African catfish (*Clarias gariepinus*) following overland transportation. *Fish Physiol. Biochem.* **2014**, *40*, 33–44. [CrossRef]
47. Polakof, S.; Panserat, S.; Soengas, J.L.; Moon, T.W. Glucose metabolism in fish: A review. *J. Comp. Physiol. B* **2012**, *182*, 1015–1045. [CrossRef] [PubMed]
48. Baßmann, B.; Brenner, M.; Palm, H.W. Stress and welfare of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) in a coupled aquaponic system. *Water* **2017**, *9*, 504. [CrossRef]
49. Baßmann, B.; Harbach, H.; Weißbach, S.; Palm, H.W. Effect of plant density in coupled aquaponics on the welfare status of African catfish, *Clarias gariepinus*. *J. World Aquac. Soc.* **2020**, *51*, 183–199. [CrossRef]
50. Palm, H.W.; Berchtold, E.; Gille, B.; Knaus, U.; Wenzel, L.C.; Baßmann, B. Growth and Welfare of African Catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) under Dietary Supplementation with Mixed-Layer Clay Mineral Montmorillonite-Illite/Muscovite in Commercial Aquaculture. *Aquac. J.* **2022**, *2*, 227–245. [CrossRef]
51. Huntingford, F.A.; Adams, C.; Braithwaite, V.A.; Kadri, S.; Pottinger, T.G.; Sandøe, P.; Turnbull, J.F. Current issues in fish welfare. *J. Fish Biol.* **2006**, *68*, 332–372. [CrossRef]
52. Kaiser, H.; Weyl, O.; Hecht, T. Observations on agonistic behaviour of *Clarias gariepinus* larvae and juveniles under different densities and feeding frequencies in a controlled environment. *J. Appl. Ichthyol.* **1995**, *11*, 25–36. [CrossRef]
53. Günther, V.; Lindert, U.; Schaffner, W. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 1416–1425. [CrossRef]
54. Jeong, J.; Eide, D.J. The SLC39 family of zinc transporters. *Mol. Asp. Med.* **2013**, *34*, 612–619. [CrossRef]

55. Wu, D.M.; Liu, T.; Deng, S.H.; Han, R.; Xu, Y. SLC39A4 expression is associated with enhanced cell migration, cisplatin resistance, and poor survival in non-small cell lung cancer. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7211. [[CrossRef](#)]
56. Swaleh, S.B.; Banday, U.Z.; Asadi, M.A.; Usmani, N. Biochemical profile and gene expression of *Clarias gariepinus* as a signature of heavy metal stress. *Environ. Pollut.* **2020**, *264*, 114693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kari, Z.A.; Kabir, M.A.; Dawood, M.A.; Razab, M.K.A.A.; Ariff, N.S.N.A.; Sarkar, T.; Pati, S.; Edinur, H.A.; Mat, K.; Ismail, T.A.; et al. Effect of fish meal substitution with fermented soy pulp on growth performance, digestive enzyme, amino acid profile, and immune-related gene expression of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* **2022**, *546*, 737418. [[CrossRef](#)]
58. Coppola, C.L.; Enns, R.M.; Grandin, T. Noise in the animal shelter environment: Building design and the effects of daily noise exposure. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* **2006**, *9*, 1–7. [[CrossRef](#)]
59. Kunc, H.P.; Schmidt, R. The effects of anthropogenic noise on animals: A meta-analysis. *Biol. Lett.* **2019**, *15*, 20190649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Bart, A.N.; Clark, J.; Young, J.; Zohar, Y. Underwater ambient noise measurements in aquaculture systems: A survey. *Aquac. Eng.* **2001**, *25*, 99–110. [[CrossRef](#)]
61. Wysocki, L.E.; Dittami, J.P.; Ladich, F. Ship noise and cortisol secretion in European freshwater fishes. *Biol. Conserv.* **2006**, *128*, 501–508. [[CrossRef](#)]
62. Hang, S.; Zhao, J.; Ji, B.; Li, H.; Zhang, Y.; Peng, Z.; Zhou, F.; Ding, X.; Ye, Z. Impact of underwater noise on the growth, physiology and behavior of *Micropterus salmoides* in industrial recirculating aquaculture systems. *Environ. Pollut.* **2021**, *291*, 118152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

The Influence of Different Feeding Time Management on the Growth and Stress Response of the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchel, 1822) Under Farming Conditions

Marc-C. Hildebrand * , David Runge, Björn Bassmann  and Harry W. Palm 

Department of Aquaculture and Sea-Ranching, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, University of Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 6, D-18059 Rostock, Germany; harry.palm@uni-rostock.de (H.W.P.)

* Correspondence: marc-christopher.hildebrand@uni-rostock.de; Tel.: +49-(0)381-498-3745

Abstract

In this study, the growth and welfare of the African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) were investigated under industrial farming conditions. For this purpose, the growing success (cm, g) and typical stress related parameters (glucose-, lactate-, cortisol-concentrations, growth hormone, HSI-liver index) were investigated on the African catfish (102–841 g) in relation to an external stressor (working light and noise) and different feeding regimes (day, night, and day and night feeding) over 83 days. As no significant effects were found among the experimental feeding treatments in relation to the growth performance and investigated stress parameters, the time of feeding seems to have less impact to the production success and stress reactions as suggested before. Regarding our results, the effect of feeding conditioning could have played a strong factor likewise the ageing process of the reared fish species which is known to be rather photophobic. Therefore, the factor of conditioning and its influence to the time shift in feeding regimes and the impact of noise and light stressors during feeding should be investigated separately in future experiments to obtain further results in this context and clarify the validity of the best feeding conditions for African catfish.

Keywords: aquaculture; stress; RAS systems; cortisol; feeding management

Key Contribution: The growth of African catfish remains unaffected by different feeding times. Conditioning effect allows the light-shy catfish to feed even during the day. A promising research approach for catfish farming.



Academic Editors: Yafei Duan,
Yanming Sui, Changhong Cheng and
Kai Zhang

Received: 30 May 2025

Revised: 22 June 2025

Accepted: 28 July 2025

Published: 18 August 2025

Citation: Hildebrand, M.-C.; Runge, D.; Bassmann, B.; Palm, H.W. The Influence of Different Feeding Time Management on the Growth and Stress Response of the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchel, 1822) Under Farming Conditions. *Fishes* **2025**, *10*, 414. <https://doi.org/10.3390/fishes10080414>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Today, fish of many different species are reared in aquaculture facilities and raised for food production. The farmed fish passes through several stages of production, beginning at an age of several months as fry or fingerlings up to its slaughter weight and its end of the production under various forms of standardized husbandry conditions. In this process, the cultured fish are exposed to the usual industrial routines under various environmental conditions. These conditions range from varying water parameters, intensive illumination, increased noise levels in the production rooms and in the holding tanks to temporal changes in their feeding. This can affect not only the stress tolerance of the fish and therefore their welfare status, but also their feed intake, growth, and the final biomass of a production batch. In order to optimize the production success and improve the welfare of the fish, the

husbandry conditions should be adapted to the biological preferences of the fish species introduced. The African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), introduced to Europe in the early 1960s, has an excellent feed conversion rate FCR (1.3) [1,2] among many other farmed fish species for food production and can be reared under the most adverse environmental conditions [3]. Due to its simplicity of husbandry, resilience to many environmental parameters and robust body shape, this farmed fish species is increasingly being bred for commercial food production in European countries [4,5]. Unlike many diurnal fish species that feed primarily during daylight hours, *C. gariepinus*, as a nocturnal species, typically feeds at dawn to night in the wild on its diet of small fish, amphibians and other food leftovers [6–8]. Their vision is well adapted to twilight and color perception [9]. However, the predatory catfish do not only have to rely on their eyes to hunt prey, but can also rely on their olfactory sense, their barbels, and also on their electrical perception to detect prey [10]. Research on this topic has already shown that there is also a dependency in the food intake of nocturnal species on the time of day [11]. Since it is known that the day/night rhythm of the fish is also controlled by the hormone balance, the light (intensity/duration) can influence the hormone level of the animals and thus cause an adapted behavior of the animals [12,13]. Therefore, it may be beneficial to feed catfish in aquaculture systems during the evening and nighttime hours. Initial studies on the rearing of African catfish fingerlings have already shown dependencies of mortality rates and growth on different light conditions [14]. Here, the light sensitivity of *C. gariepinus* was described as rather photophobic, resulting in a farming recommendation under shaded conditions for this species [14–16]. Furthermore, additional research showed dependencies on selected color spectra and intensities (yellow/low brightness) that were well suited for the developmental phase of *C. gariepinus* (larvae) and supported an improved habitus of the fish at this age [17,18]. Various studies on the influence of the illumination regime have already shown that illuminance, color choice or duration of illumination all have a certain influence on the behavior, mortality, or habitus of African catfish [15,17,19]. However, the parameter of duration in illumination probably seems to have a greater effect than, for example, the choice of color [19,20]. As the stocking density of African catfish should undergo changes with increasing age [21–23], the influence of light could also have a different significance in mature than in juvenile fish populations (light sensitivity) and should therefore also be investigated more closely under cultured conditions. Besides the influence of light conditions on the feeding behavior of fish, noise pollution (industrial noise machines, work noise, facility noise technology) can also play a significant role in feeding behavior and ultimately on biomass growth [24–28]. The noise sensitivity of African catfish and related species has already been investigated in several studies and has been classified as sensitive [29,30]. The conspecific catfish species *Lophiobagrus cyclurus* demonstrated increased sensitivity to noise levels of 81.6 dB (re 1 μ Pa at 1 kHz), suggesting vulnerability to prevalent forms of noise pollution [31–33]. Noise also has a greater potential to be transmitted into the enclosure through external vibrations, particularly in RAS facilities, where pump connecting pipes pass through the enclosure and its outer walls, allowing vibrations from outside to propagate inside [34,35]. Despite the potentially high noise levels in industrial RAS (recirculating aquaculture system) facilities, the sensitivity of catfish to such noise has not yet been examined. As this could be a critical factor in the welfare of hearing-sensitive fish species, it warrants thorough investigation. Several studies focusing on industrially relevant fish species such as *Oreochromis* spp. [36], *Salmo salar* [37], and *Cyprinus carpio* among others [38], have explored the pronounced sensitivity of these species to light or acoustic stimuli. Given that the majority of these investigations reported beneficial outcomes, the use of light and sound emissions may also represent a promising tool within conditioning programs for African catfish (*Clarias gariepinus*). These stimuli should therefore be considered potential

tools for optimizing husbandry conditions in aquaculture through targeted manipulation. Moreover, various experiments have demonstrated the influence of different environmental conditions in industrial aquaculture facilities due to light and noise on the biological stress response of fish and thus on the expression of cortisol, glucose, and other stress-related parameters [15,16,39–41]. Therefore, this correlation should also be investigated in relation to regular feeding routines and their associated stress impact for nocturnal feeders. In order to investigate and verify the combined influence of illumination periods, typical industrial noise pollution and recommended feeding times on the fish stress level and production success, essential stress parameters such as glucose, lactate, cortisol, and growth hormone should be tested within a combined experiment design. In the current study, fish welfare-related stress was assessed by measuring glucose, lactate, and cortisol concentrations in combination with a time-specific feeding regime for the African catfish (*Clarias gariepinus*) under industrial farming conditions. These conditions refer to large-scale RAS facilities with high stocking densities and substantial biomass, where fish are frequently exposed to environmental stressors such as noise from radios, staff activity, and other disturbances typical of enclosed working environments. This experiment attempts to validate the most effective feeding time for this popular aquaculture species (*C. gariepinus*) by evaluating production performance in relation to the physiological stress responses associated with different feeding routines.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design

The experimental trial was conducted over a period of 83 days, from January to April 2018, in the enclosed recirculating aquaculture system (RAS) facility located within the ‘Fish Glass House’ at the University of Rostock. The experimental facility consists of nine equal fish tanks, a sediment separator, a UV light bypass, and a trickling biofilter unit. Dimensions of the used culture tanks were 1.84×0.95 m with a processed water volume of 1.22 m^3 per tank each which resulted in a total process water volume of 15.13 m^3 of the total facility including the filter volumes. To validate the feeding and growth of the African catfish, three different feeding routines as treatment groups (day feeding, night feeding, day and night feeding) were examined in a complete randomized block design (CRB) during the duration of the experiment. This setup was designed to replicate commercial RAS systems commonly used in northern Germany, allowing for optimal comparability of the system configuration and the data obtained. In addition, an artificial stress regime was simulated for all test groups through the application of work lighting ($598.6 \text{ lx} \pm 3.6$) and radio music (79.8 dB m^2) daily from 9 am to 6 pm. Overhead lights and radio speakers were installed above designated tanks. Subsequently, light intensity and sound volume were measured and standardized at the water surface level to ensure consistent exposure conditions across all tanks. Fish welfare indicators as values of serum glucose, lactate, plasma cortisol and growth hormone, and the hepatosomatic index and weight of the liver from 33 fish of a treatment group were determined on day 60.

2.2. Fish Stocking and Feeding

A total of 765 African catfish (*Clarias gariepinus*) were used in the experiment. The fish were obtained from the Dutch company Fleuren & Nooijen and divided into three experimental groups, each consisting of three tanks with 85 fish per tank. The respective mean weights of the groups were $107.13 \pm 30.29 \text{ g}$ (day), $101.46 \pm 23.88 \text{ g}$ (night) and $102.81 \pm 25.07 \text{ g}$ (day and night). Accordingly, the initial stocking density was approximately 8.28 kg/m^3 , increasing to 69.29 kg/m^3 by the end of the experiment. The experimental groups were fed at different intervals, so that the day group was fed six

times every 2 h during the day (7:00 to 17:00), the night group six times every 2 h at night (19:00 to 5:00) and the day/night group was fed continuously six times every 4 h (1:00 to 21:00). All tanks were equipped with automatic feeders following a standard feeding protocol of coppens feed table for ME-4.5 Meerval Top. The feed used had the following composition: Crude protein (44.0%); crude fat (14.0%); crude fiber (1.4%); crude ash (8.5%); calcium (2.0%); sodium (0.5%); phosphorus (1.2%); E672 Vitamin A (5000 U.I/Kg); E671 Vitamin D3 (750 U.I/Kg); iron (42.0 mg/Kg); iodine (2.1 mg/Kg); copper (5.0 mg/Kg); manganese (16.0 mg/Kg); zinc (100.0 mg/Kg); E324 Etoxyquin (50.0 mg/Kg) (Skretting, Fontaine-lès-Vervins, Frankreich, ME-4.5 Meerval Top, 4.5 mm).

2.3. Sampling

During the experimental period of 83 days, 28 fish were sampled at the beginning, the middle, and the end of the experiment (all four weeks) from each of the three experimental tanks within each experimental group. For all sampled fish, weight and length measurements were recorded. Additionally, blood and liver samples were collected from five fish at each sampling point to analyze liver- and stress-related parameters. Blood samples were collected from the caudal vein of each fish to analyze stress-associated parameters. Glucose and lactate levels were measured immediately during blood sampling using portable devices: glucose concentration was determined with the Accu-Chek Aviva (Roche, Mannheim, Germany), and lactate concentration with the Accutrend Plus (Roche, Mannheim, Germany). To quantify cortisol and growth hormone levels, blood plasma was later analyzed. For this purpose, blood was collected in EDTA-coated tubes and stored at 4 °C until centrifugation. Samples were centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min using a Hettich Universal 320 R centrifuge. The plasma was then analyzed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. Cortisol levels were determined with the CSB-E08487f ELISA kit, and growth hormone concentrations with the CSB-E12121Fh ELISA kit (Cusabio, Houston, TX, USA). Absorbance values were measured using an iMark Microplate Reader photometer.

Test animals designated for sampling were anesthetized in ice water prior to each sample collection (15 min), in accordance with animal welfare regulations, and were only processed further after complete anesthesia was confirmed. Typical growth factors such as the feed ratio SGR, the mortality rate, the condition factor, the mass and length gain, the fillet yield, the feeding rate and the hepatosomatic index were as well calculated from the collected data.

The specific growth rate (SGR %/day):

$$\frac{(\ln(W_1) - \ln(W_2)) * 100}{(t_1 - t_0)} = \text{SGR} \left(\frac{\%Bw}{d} \right) \quad (1)$$

W_1 = End biomass;

W_2 = Initial biomass;

t_1 = Duration in days;

t_0 = Duration in days.

The feed conversion ratio (FCR):

$$\frac{TFI}{(W_1 - W_0)} = \text{FCR} \quad (2)$$

TFI = Total feed intake;

W_1 = Final fish weight (g);

W_0 = Initial fish weight (g).

Hepatosomatic index:

$$\frac{(W_L * W_B)}{100} = \text{HPI}(\%) \quad (3)$$

W_L = Liver weight;

W_B = Bodyweight.

Mortality:

$$\frac{n_{dead}}{n_0} * 100 = Mo(\%) \quad (4)$$

N_0 = Initial fish number;

N_{dead} = Number of dead fish.

Growth in length:

$$L_1 - L_0 = Growth \text{ (cm)} \quad (5)$$

L_0 = Initial fish number;

L_1 = Number of dead fish.

Growth in weight:

$$W_0 - W_1 = Growth \text{ (g)} \quad (6)$$

W_0 = Initial fish number;

W_1 = Number of dead fish.

Condition factor:

$$(W_B * L_B) = K \quad (7)$$

W_B = Weight body;

L_B = Length body.

2.4. Water Analysis

Daily, physicochemical water parameters, including temperature, oxygen saturation, electrical conductivity (EC), and redox potential, were measured between 8:00 and 10:00 a.m. prior to feeding, using a portable multiparameter meter (HQ40D, Hach Lange, Berlin, Germany). In addition, concentrations of common chemical water parameters, including ammonium (NH_4^+), nitrite (NO_2^-), nitrate (NO_3^-), iron (Fe^{2+}), potassium (K^+), magnesium (Mg^{2+}), calcium (Ca^{2+}), sulfate (SO_4^{2-}), and phosphate (PO_4^{3-}), were determined twice weekly from the recirculating water. Samples were collected on designated days, cooled, and stored for subsequent photometric analysis using an automated photometer (Gallery™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.5. Disturbances and Welfare Indicators

In order to include the additional influence of daily work routines of commercial aquaculture facilities on the feeding behavior in relation to the feeding times, a stress regime (light and noise) was added via a time control. For the implementation of the stress regime, 3W LED lights were positioned above the tanks and their illuminance was set to $598.6 \text{ lx} \pm 3.6$ and subsequently checked using a lux meter (type: LM-200, “Eurolite”, Langenau, Germany). The simulation of the noise level was realized by placing several radios at the same distance from the fish tanks. The sound level of 79.8 dB m^2 was checked and adjusted for each fish tank using a measuring device (LEQ sound meter PCE-353). Further, relevant welfare indicators (glucose, lactate, cortisol, growth hormones, and the HIS-Index of the liver weight) for the determination of the stress load were then collected once during the sampling. For this purpose, the blood serum taken from the caudal vein of the fish was used to determine the glucose and lactate values. The glucose value was measured using the Accu-Check Aviva measuring device and the lactate value was measured using the Accutrend Plus measuring device, both from (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Germany). For the measurement of cortisol and growth hormone concentrations in blood plasma, a blood sample was transferred to EDTA BD vacutainer after initial

collection and kept refrigerated until centrifugation (4 °C, 1500× g, 10 min; Universal 320 R, Hettich, Tuttlingen, Germany). The cortisol and growth hormone concentrations were then determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the respective test kits (Fish Cortisol ELISA Kit CSB-E08487f, Cusabio; GH ELISA Kit CSB-E12121Fh, Cusabio). The resulting absorbance values were then analyzed using a microplate reader (iMark Microplate Absorbance Reader, Bio-RAD, Feldkirchen, Germany).

2.6. Statistic

Generated data sets were summarized for the growth measurements for each treatment group (d/night/day and night) and over the entire duration according to their treatment for statistical evaluation. The measurement data of the animal welfare indicators were summarized only according to their treatment affiliation. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 27.0 (IBM Corp., 2020, Armonk, NY, USA) and the selected significance level of $p < 0.05$. The normal distribution and variance homogeneity of the data were checked using the Shapiro–Wilk and Levene’s test. Normally distributed data sets were evaluated using a single-factor analysis of variance (ANOVA) with a significance level of $p < 0.05$. If the data were not normally distributed, a non-parametric Kruskal–Wallis test was used. If the analysis of variance indicated homogeneous values, a Tukey–HSD post-hoc test was used for further evaluation. If the data was not homogeneously distributed, a Dunnett T3 post-hoc test was used instead. The standard curve for determining the cortisol and growth hormone concentrations was carried out with the CurveExpert, version 1.4 (Hyarms Development, 2020) program. The vapor pressure model was used for evaluation.

3. Results

3.1. Water Parameters

Mean values of the recorded water parameters from the used aquaculture recirculation system were summarized in Table 1. Water temperature and oxygen saturation were attempted to be kept constant throughout the experiment, but in the case of temperature the values fluctuated slightly as a result of technical difficulties. The measured EC values ranged from 1082.0 to 2660.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ and reached their highest peak at the end of the experiment. The pH values determined were stable for the duration of the experiment and did not fall below 4.2 pH. For all chemical water parameters, ammonia (NH_4^+), nitrate (NO_3^-), and potassium (K^+) fluctuated considerably over the entire measurement period. In the case of NH_4^+ , the values were influenced by feeding and bacterial activity in the filter system, while in the case of NO_3^- the concentration increased over time (227.37 to 912.93 mg/L).

Table 1. Total water parameter mean values during 83 days of *C. gariepinus* feeding experiments. DO as oxygen saturation. EC as electrical conductivity.

Parameters	Temp. °C	DO mg/L	EC $\mu\text{S}/\text{cm}^2$	Redox mV	pH
Mean Value	27.02	7.76	1834.28	149.62	5.78
SE $\pm$	0.06	0.05	33.22	1.59	0.07
Parameters	NH_4^+ mg/L	NO_3^- mg/L	NO_2^- mg/L	PO_4^{3-} mg/L	SO_4^{2-} mg/L
Mean Value	12.26	527.04	0.21	39.78	136.54
SE $\pm$	1.30	27.13	0.05	3.16	3.67
Parameters	K^+ mg/L	Ca^{2+} mg/L	Mg^{2+} mg/L	Fe^{2+} mg/L	
Mean Value	39.89	177.16	39.36	0.05	
SE $\pm$	4.05	4.77	1.25	0.00	

3.2. Growth and Mortality

Determined growing parameters (growth, length, SGR) of the analyzed catfishes showed no significant effects between the day, night and day and night treatment groups $p > 0.05$. Also, additional parameters like FCR and filet weight did not show to be affected by the feeding treatments (Table 2). In terms of performance metrics, fish from all treatment groups showed considerable variability in final body size, especially in weight, which was reflected in the consistently high standard deviations across treatments. Nevertheless, the condition factors of the unsorted fish of all treatment groups did not differ significantly from each other and therefore suggest a similar growth. Fish mortality ranged from $14.51 \pm 1.80\%$ to $17.65 \pm 1.18\%$ and showed no significant effect to the applied feeding treatment.

Table 2. Mean performance values of 765 African catfish (*Clarias gariepinus*) subjected to different feeding time treatments, as determined at the end of the 83-day experiment. Values are presented as means $\pm$ standard deviation (SD).

Parameters	Treatments		
	Day	Night	Day/Night
Mean feed input per tank (kg)	39.33 ± 0.30	39.32 ± 0.19	38.99 ± 0.16
Initial weight (g)	107.13 ± 30.29	101.46 ± 23.88	102.80 ± 25.07
Final weight (g)	796.47 ± 298.74	808.16 ± 283.41	841.12 ± 285.93
Initial length (cm)	24.91 ± 2.24	24.54 ± 2.01	24.77 ± 2.15
Final length (cm)	45.40 ± 4.64	45.06 ± 5.04	45.56 ± 5.88
Filet weight (g)	305.10 ± 87.12	287.86 ± 96.28	319.40 ± 98.32
Last day growth (g)	688.07 ± 8.50	657.07 ± 35.66	688.31 ± 20.91
Last day growth (cm)	20.50 ± 4.65	20.52 ± 5.24	21.09 ± 6.08
FCR	0.81 ± 0.01	0.85 ± 0.04	0.84 ± 0.03
SGR (%)	2.42 ± 0.01	2.42 ± 0.06	2.46 ± 0.03
Condition factor	0.82 ± 0.07	0.88 ± 0.05	0.85 ± 0.01
Mortality (%)	14.51 ± 1.80	14.51 ± 0.68	17.65 ± 1.18

Most indicating fish performance indicators were visualized after a 83 days experimental period for growth (Figures 1 and 2) and for the condition factor (Figure 2) of male and female catfish in the individual treatment groups. For growth, male and female catfish final weights showed less differences among the treatments and between the sexes. Some extreme values were seen from male African catfish of the day feeding treatment group but were also seen in the treatment group of day and night feeding. Female catfish seemed to be lighter in mean weight in direct comparison to the respective male conspecific but were less influenced by the set feeding treatments.

Additional regression diagram was calculated for the growth of the three treatment groups at four different sampling time points in the course of the experiment. Linear regressions were quite similar in all three feeding groups. The highest, but not statistically significant, growth was achieved by the day and night feeding group, followed by the treatment group with night feeding and the last group with day feeding (Figure 2).

Calculated condition factor values showed less differences between the feeding treatments and indicate a similar and equal growing in size and weight of the fish (Figure 3). While a higher value of the condition factor indicates a well grown fish in length and weight, a smaller value indicates a stocky and thick habitus instead.

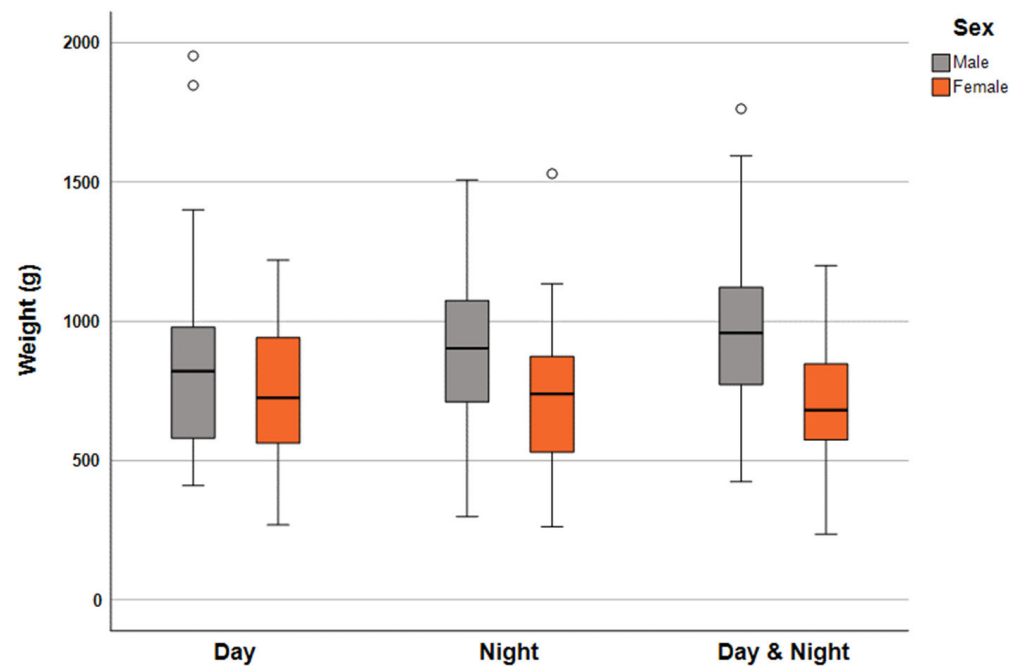


Figure 1. Final body weights of female and male African catfish (*Clarias gariepinus*) after an 83-day period under different feeding time treatments and exposure to an external light/noise stressor. Mean values were calculated based on a total of 765 fish, with 255 individuals per treatment group. Statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis test ($p = 0.05$), revealing no significant differences between groups.

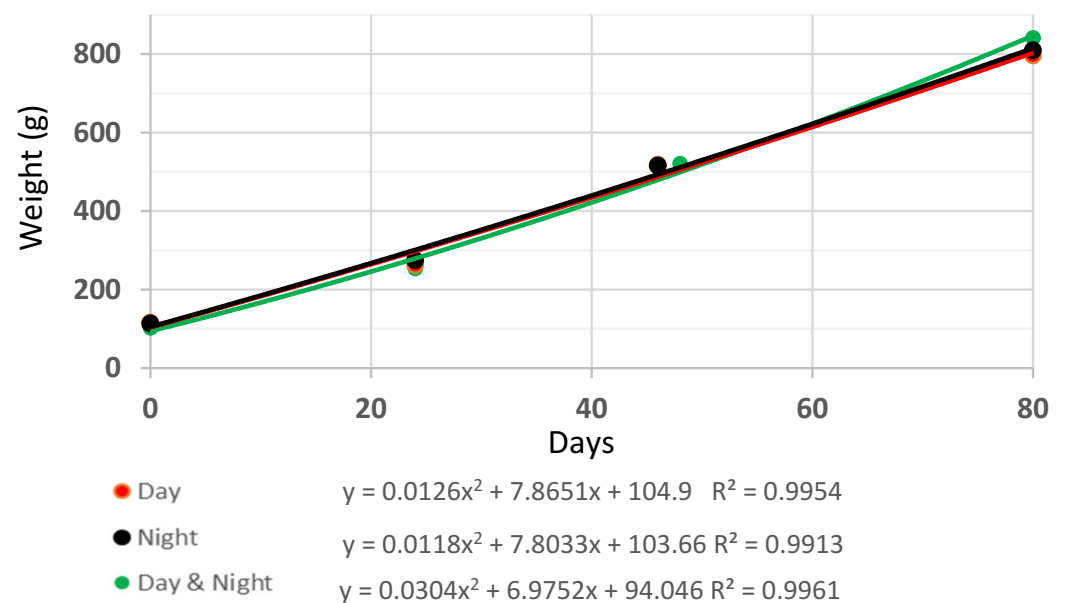


Figure 2. Linear regression analysis of growth progression in African catfish (*Clarias gariepinus*) over an 83-day feeding period under different feeding time treatments and exposure to an external stressor.

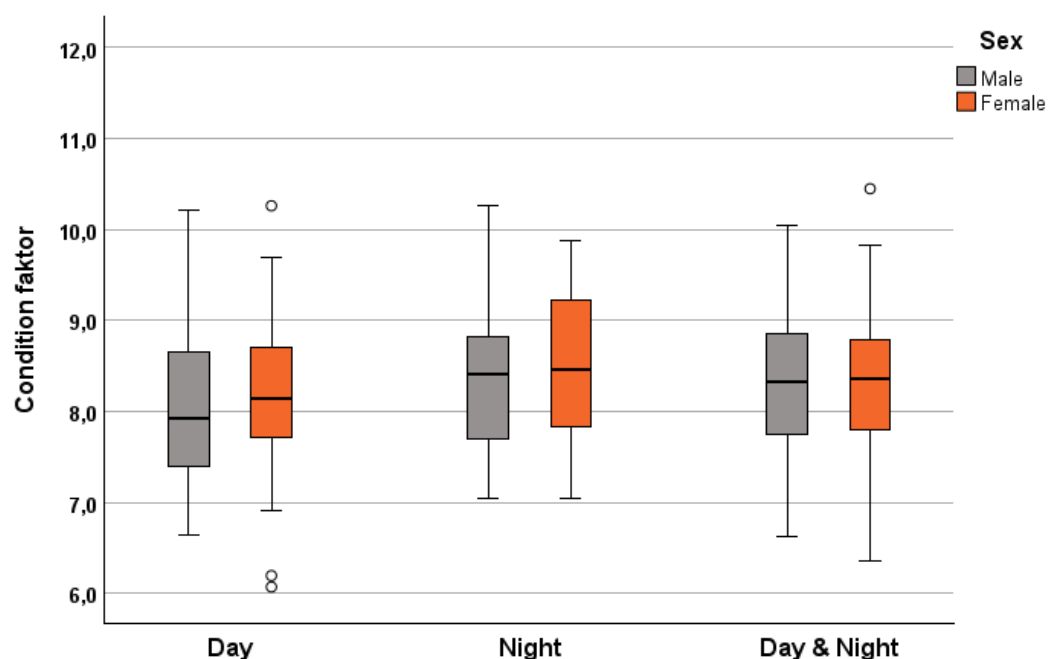


Figure 3. Condition factor of female and male African catfish (*Clarias gariepinus*) after an 83-day period under different feeding time treatments and exposure to an external stressor. Mean values were calculated based on a total of 765 fish, with 255 individuals per treatment group. Statistical analysis using the Kruskal–Wallis test ($p = 0.05$) revealed no significant differences between groups.

3.3. Welfare Indicators

Measured welfare indicators revealed no significant effects between the measured stress reaction and the set feeding treatments (Table 3). All determined indicators (glucose, cortisol, lactate, growth hormone, his, and liver weight) showed quite similar values among the set treatments of day, night, and day and night feeding without any significant effect or trend.

Table 3. Stress-related welfare indicators of African catfish (*Clarias gariepinus*) after an 83-day period under different feeding time treatments and exposure to an external stressor.

Parameters	Day $\pm$ SD	Treatments Night $\pm$ SD	Day/Night $\pm$ SD
Glucose (mmol/L)	3.76 ± 0.39	3.63 ± 0.21	3.70 ± 0.19
Cortisol (ng/mL)	32.87 ± 1.77	33.26 ± 1.30	33.63 ± 2.48
Lactate (mmol/L)	2.60 ± 1.43	2.52 ± 1.39	2.52 ± 0.83
Growth hormone (pg/mL)	715.60 ± 61.63	747.63 ± 47.15	721.85 ± 55.34
HSI-Index	1.31 ± 0.34	1.26 ± 0.33	1.29 ± 0.25
Liver weight (g)	11.29 ± 5.92	10.46 ± 5.38	11.89 ± 5.09

4. Discussion

The growth of the African Catfish was investigated under industrial farming conditions against the influence of different feeding times (day, night, day and night). For this purpose, an experiment was performed to simulate the typical routine working environment by illuminating it with industrial lights and noise from 9:00 to 18:00. Since no data sets for the growth of African catfish under such conditions have been published yet, the collected data enables us to determine the fish performance under industrial conditions for the first time. Thus, this study is providing new datasets that take into account the

feeding behavior and stress sensitivity of the catfish species, which is described as rather photophobic, under commercial husbandry.

Analyzed physical and chemical water parameters did not reveal any significant effect to the set feeding treatments and stressor as the amount of the feed were also similar among the treatments. Typically, fluctuations of NH_4^+ and NO_2^- were observed during the experiment as the biofilter activity was reacting to the feeding of the fish per tank and are therefore expectable observations [42]. All determined physico-chemical water parameters were found in acceptable ranges for the African catfish [43,44]. To the end of the experiment the quality parameters of the circulating water are clearly unaffected by the set feeding routines.

The final biomass of a raised fish species in a cultivating experiment usually provides reliable information about the farming success and food conversion of the fish. Consequently, the final biomasses were also calculated in the present experiment. However, no significant differences in the final biomass or growth were detected among the experimental groups in the experiment. In terms of numerical values, fish of the day and night feeding treatment showed the highest final weight, biomass, and growth in mass after 4 weeks of feeding followed by the fish of the night treatment and at last day treatment. Nevertheless, the determined performance values and additional parameters of weight, length, growth, FCR, SGR, K-Factor, and mortality did not show any trend or seemed to be affected by the feeding treatments and additional stressor at the end of the experiment. Therefore, the feeding at day seems to have the same impact to the growth of the fish as the feeding at night time. This contradicts the research of [14,45], who claimed better growth and less mortality of African catfish at a shadowed to night shift photo regime. Even though [45] had shown some positive effects of feeding under shaded to dark conditions for nocturnal fish species (*C. gariepinus*) on growth and conversely [19] had described better growth conditions for *C. gariepinus* under bright light conditions, none of the observations previously made in the mentioned studies above could be confirmed by the results of the current study. The observed tendency of light avoidance could not be confirmed in this study, as no significant differences were found in growth parameters across the different feeding time treatments, particularly between the day and night feeding groups, nor in mortality rates. This suggests that the calculated effect size and the sample size employed in this trial may have been insufficient to detect statistically significant effects. As the calculated performance values of FCR, SGR, and final growth also did not differ statistically from each other, it could be questionable that the fish had been adopted to the feeding times by conditioning and overcome their habit of photophobic behavior in this context. In a study by [11], the feed acceptance of African catfish (*Clarias gariepinus*) was assessed across different times of the day, revealing a significantly higher acceptance during nighttime periods. Moreover, certain individuals developed consistent feeding patterns during the early morning and late evening hours, indicating an initial influence of temporal feed conditioning aligned with the daily light–dark cycle. Complementary findings were reported by [9,46], who examined the effects of conditioning on both diurnal and nocturnal fish species, including *Gadus morhua* and *Clarias gariepinus*. Their results emphasized the potential of conditioning to alter natural behavioral rhythms. This method is hypothesized to exert a significant effect and may offer practical benefits to aquaculture practitioners in terms of feeding efficiency and fish harvesting. Conditioning in nocturnal fish, as well as stress levels at the respective feeding times, should be further investigated regardless of the time of day, age group, and working rhythm in aquaculture facilities in order to obtain further results in this context and clarify the validity of the best feeding conditions for African catfish. Within the context of this study, concentrations of established physiological welfare indicators—including glucose, lactate, cortisol, and growth hormone—were quantified, as these parameters are recognized for their sensitivity to stress responses elicited by various abiotic and biotic stres-

sors, such as elevated stocking density, handling procedures (e.g., netting), and increased light intensity [15,47–49]. Since no significant effects were found among all analyzed indicators of the treatment groups, the set feeding regimes did not seem to have an impact on the fish's stress level. Although ref. [45] had indicated a possible influence of feeding times on resistance to stress responses in fish, and ref. [50] reported lower lactate concentrations in fish fed at night, these effects could not be detected in the results of the current study, as cortisol and lactate levels were stable under the feeding regimes analyzed. Further, ref. [40] had measured cortisol and glucose concentrations of African catfish in an aquatic experiment under light conditions ranging from 410 to 1060 lux. At the end of the experiment from [40], cortisol values averaging 14.7 ng/mL and 12.7 ng/mL, respectively, and glucose concentrations averaging 3.2 mmol/L were determined. In the current experiment, cortisol and glucose concentrations of $33.25 \text{ ng/mL} \pm 0.38$ and $3.70 \text{ mmol/L} \pm 0.07$ were measured, which, compared to the study by [40], could indicate a stress reaction during the day feeding and additional active artificial stressors. Additionally, we recognized a relative increased number of bite marks on the skin of the fish which were fed only at day time. As aggressive behavior was often associated with stress reactions before [15,16,45], especially by photophobic species, the agonistic behavior of African catfish of the current study, which got fed only at day, may therefore have been influenced by their feeding treatment. Unfortunately, this was not investigated any further by this study and should be observed in future studies. The importance of environmental conditions on the expression of hormones such as growth hormones has already been emphasized by [51]. Thus, according to [52,53], growth hormones can have a direct influence on the behavior of fish in terms of aggressiveness, appetite or foraging behavior. In the case of *Oncorhynchus mykiss*, the relation to the feeding regime and the measured concentration of growth hormones was already demonstrated by [54]. Unfortunately, such overlapping effects could not be observed in the current study, as the results of the groups studied were insignificant.

In animal health studies, the liver is known for its detoxifying role in metabolism, but also for its energy storage capacity (e.g., glycogen). The HIS-Index can be used to evaluate the storage capacity of a fish liver and is also dependent by environmental factors. Low environmental conditions are often related to a low HIS-Index as the energy capacity is then modest [22,55]. Optimal environmental conditions can therefore allow a greater capacity to the liver. Ref. [55] showed an HIS-Index of 1.05 to 1.46% in *C. gariepinus* in feeding experiments using different types of diets. In a toxicity experiment with a plant extract from *Lepidagathis aloecuroides* by [22], a lower HIS-Index of 0.6 and 0.83% was determined. However, the HIS-Index for this study was calculated at $1.29\% \pm 0.03$, which places it between those of the other two studies. Nevertheless, no difference in the HIS-Index was found between the test groups with the selected sample size.

5. Conclusions

The parameters examined in the current experiment—mortality, growth, stress indicators, liver weight—all remained unaffected by the feeding treatment groups used and the stressor added at daytime (light and noise). Thus, the feeding for the African catfish during the day seems to achieve the same growth success as night feeding. Although no significant results were found between the feeding groups of nocturnal catfish in terms of growth and stress associated parameters, the effect of conditioning may have been essential in this experiment. The potential of feed conditioning for *Clarias gariepinus*, which exhibits a notable growth rate and a feed conversion ratio, represents a promising avenue for further research.

Author Contributions: Conceptualization, B.B.; methodology, D.R. and B.B.; validation, B.B. and D.R.; formal analysis, D.R.; investigation, B.B. and D.R.; resources, B.B.; data curation, M.-C.H.; writing—original draft preparation, M.-C.H.; writing—review and editing, M.-C.H.; visualization, M.-C.H.; supervision, H.W.P.; project administration, H.W.P.; funding acquisition, H.W.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the European Union and EIP-AGRI operational groups for supporting research in aquaponics fish and plant production ('Aquaponik in MV', BNRZD: 13 903 000 0103; WM-EIP-0007-15) and by the Ministry for Climate Protection, Agriculture, Rural Areas and the Environment of Mecklenburg-Western Pomerania (Germany).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted approved by Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (Protocol number: 7221.3-1-021/16, Approval date: 28 June 2016).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are not publicly available, although they are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We thank all employed scientific personal of the department for aquaculture of the university of Rostock which helped us to realize this experiment and helped with the sampling routines.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of the data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Ikeogu, C.F.; Ogbonnaya, H.F.; Okpala-Ezennia, K.P.; Oforah, P.C. Effects of Two Feeding Rates on the Growth Performance and Survivability of *Clarias gariepinus* Fingerlings Fed on Skretting Fish Feed. *Glob. J. Fish. Sci.* **2020**, *2*, 30–34. [\[CrossRef\]](#)
2. Palm, H.W.; Berchtold, E.; Gille, B.; Knaus, U.; Wenzel, L.C.; Baßmann, B. Growth and Welfare of African Catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) under Dietary Supplementation with Mixed-Layer Clay Mineral Montmorillonite-Illite/Muscovite in Commercial Aquaculture. *Aquac. J.* **2022**, *2*, 227–245. [\[CrossRef\]](#)
3. Păpuc, T.; Petrescu-Mag, I.V.; Gavriloiu, C.; Botha, M.; Kovacs, E.; Coroian, C.O. Swimming in the Mud—a Short Review of Environmental Parameter Ranges Tolerated by *Clarias gariepinus*. *Extrem. Life Biospeology Astrobiol.* **2019**, *11*, 9–17.
4. Rosa, R.; Bandarra, N.M.; Nunes, M.L. Nutritional Quality of African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822): A Positive Criterion for the Future Development of the European Production of Siluroidei. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2007**, *42*, 342–351. [\[CrossRef\]](#)
5. Pasch, J.; Palm, H.W. Economic Analysis and Improvement Opportunities of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Aquaculture in Northern Germany. *Sustainability* **2021**, *13*, 13569. [\[CrossRef\]](#)
6. Davies, F. Use of Soybean Flour (Dehulled, Solvent-Extracted Soybean) as a Fish Meal Substitute in Practical Diets for African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822): Growth, Feed Utilization and Digestibility. *J. Appl. Ichthyol.* **2001**, *17*, 64–69. [\[CrossRef\]](#)
7. Dadebo, E.; Aemro, D.; Tekle-Giorgis, Y. Food and Feeding Habits of the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Pisces: Clariidae) in Lake Koka, Ethiopia. *Afr. J. Ecol.* **2014**, *52*, 471–478. [\[CrossRef\]](#)
8. Momoh, P.; Solomon, R.J. Physiochemical Parameters of Catfish (*Clarias gariepinus*) Fed a Combination of Rice Bran and Irish Potatoes. *Direct Res. J. Vet. Med. Anim. Sci.* **2017**, *2*, 36–50.
9. Lee, C.K.; Kawamura, G.; Senoo, S.; Ching, F.F.; Luin, M. Colour Vision in Juvenile African Catfish *Clarias gariepinus*. *Int. Res. J. Biol. Sci.* **2014**, *3*, 36–41.
10. Hanika, S.; Kramer, B. Electric Organ Discharges of Mormyrid Fish as a Possible Cue for Predatory Catfish. *Naturwissenschaften* **1999**, *86*, 286–288. [\[CrossRef\]](#)
11. Hossain, M.A.R.; Batty, R.S.; Haylor, G.S.; Beveridge, M.C.M. Diel Rhythms of Feeding Activity in African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquac. Res.* **1999**, *30*, 901–905. [\[CrossRef\]](#)
12. Bolliet, V.; Bégay, V.; Taragnat, C.; Ravault, J.P.; Collin, J.P.; Falcón, J. Photoreceptor Cells of the Pike Pineal Organ as Cellular Circadian Oscillators. *Eur. J. Neurosci.* **1997**, *9*, 643–653. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Boeuf, G.; Le Bail, P.-Y. Does Light Have an Influence on Fish Growth? *Aquaculture* **1999**, *177*, 129–152. [\[CrossRef\]](#)

14. Appelbaum, S.; Kamler, E. Survival, Growth, Metabolism and Behaviour of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) Early Stages under Different Light Conditions. *Aquac. Eng.* **2000**, *22*, 269–287. [\[CrossRef\]](#)
15. Almazán-Rueda, P.; Van Helmond, A.T.M.; Verreth, J.A.J.; Schrama, J.W. Photoperiod Affects Growth, Behaviour and Stress Variables in *Clarias gariepinus*. *J. Fish Biol.* **2005**, *67*, 1029–1039. [\[CrossRef\]](#)
16. Manuel, R.; Boerrigter, J.G.J.; Cloosterman, M.; Gorissen, M.; Flik, G.; Van Den Bos, R.; Van De Vis, H. Effects of Acute Stress on Aggression and the Cortisol Response in the A Frisan Sharptooth Catfish *Clarias gariepinus*: Differences between Day and Night. *J. Fish Biol.* **2016**, *88*, 2175–2187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Sallehudin, M.F.; Yusoff, N.A.; Tan, N.H.; Saad, S.; Mukai, Y. Optimum Light Wavelength and Light Intensity for Rearing Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Int. J. Aquat. Sci.* **2017**, *82*, 107–112.
18. Hildebrand, M.-C.; Hentrich, N.; Palm, H.W. The Role of Light in the Rearing of *Clarias gariepinus* Larvae: Effects on Behaviour, Growth and Survival. *Aquac. Rep.* **2024**, *39*, 102420. [\[CrossRef\]](#)
19. Mustapha, M.; Okafor, B.; Olaoti, K.; Oyelakin, O. Effects of Three Different Photoperiods on the Growth and Body Coloration of Juvenile African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Arch. Pol. Fish.* **2012**, *20*, 55–59. [\[CrossRef\]](#)
20. Solomon, R.J.; Okomoda, V.T. Effect of Photoperiod on Some Biological Parameters of *Clarias gariepinus* Juvenile. *J. Stress Physiol. Biochem.* **2012**, *8*, 47–54.
21. Abdullahi Biu, A. Effects of Sorting on Cannibalism in Catfish (*Clarias gariepinus*) Rose in Concrete Tanks in Maiduguri, North-Eastern Nigeria. *Anim. Vet. Sci.* **2015**, *3*, 67. [\[CrossRef\]](#)
22. Gabriel, U. COMPARISON OF SOME FISH SORTING TOOLS FOR GRADING *Clarias gariepinus* FINGERLINGS. *J. Aquac. Eng. Fish. Res.* **2016**, *2*, 109–118. [\[CrossRef\]](#)
23. Wenzel, L.C.; Berchtold, E.; Palm, H.W. Effects of Stocking Density and Grading on Behaviour, Cannibalism and Performance of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Fry. *Aquac. Rep.* **2022**, *27*, 101400. [\[CrossRef\]](#)
24. Dytham, C.; Simpson, S. Elevated Mortality of Fish Larvae on Coral Reefs Drives the Evolution of Larval Movement Patterns. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2007**, *346*, 255–264. [\[CrossRef\]](#)
25. Shafiei Sabet, S.; Van Dooren, D.; Slabbekoorn, H. Son et Lumière: Sound and Light Effects on Spatial Distribution and Swimming Behavior in Captive Zebrafish. *Environ. Pollut.* **2016**, *212*, 480–488. [\[CrossRef\]](#)
26. Simpson, S.D.; Radford, A.N.; Nedelec, S.L.; Ferrari, M.C.O.; Chivers, D.P.; McCormick, M.I.; Meekan, M.G. Anthropogenic Noise Increases Fish Mortality by Predation. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10544. [\[CrossRef\]](#)
27. Wang, Z.-T.; Akamatsu, T.; Nowacek, D.P.; Yuan, J.; Zhou, L.; Lei, P.-Y.; Li, J.; Duan, P.-X.; Wang, K.-X.; Wang, D. Soundscape of an Indo-Pacific Humpback Dolphin (*Sousa Chinensis*) Hotspot before Windfarm Construction in the Pearl River Estuary, China: Do Dolphin Engage in Noise Avoidance and Passive Eavesdropping Behavior? *Mar. Pollut. Bull.* **2019**, *140*, 509–522. [\[CrossRef\]](#)
28. Kusku, H.; Ergun, S.; Yilmaz, S.; Guroy, B.; Yigit, M. Impacts of Urban Noise and Musical Stimuli on Growth Performance and Feed Utilization of Koi Fish (*Cyprinus carpio*) in Recirculating Water Conditions. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* **2019**, *19*, 513–523. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Popper, A.N.; Lu, Z. Structure–Function Relationships in Fish Otolith Organs. *Fish. Res.* **2000**, *46*, 15–25. [\[CrossRef\]](#)
30. Duan, S.; Vasconcelos, R.O.; Wu, L.; Li, X.; Sun, W.; Li, X. Managing Aquaculture Noise: Impacts on Fish Hearing, Welfare, and Mitigation Strategies. *Rev. Aquac.* **2025**, *17*, e70013. [\[CrossRef\]](#)
31. Bart, A.N.; Clark, J.; Young, J.; Zohar, Y. Underwater Ambient Noise Measurements in Aquaculture Systems: A Survey. *Aquac. Eng.* **2001**, *25*, 99–110. [\[CrossRef\]](#)
32. Lechner, W.; Heiss, E.; Schwaha, T.; Glösmann, M.; Ladich, F. Ontogenetic Development of Weberian Ossicles and Hearing Abilities in the African Bullhead Catfish. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18511. [\[CrossRef\]](#)
33. Hang, S.; Zhao, J.; Ji, B.; Li, H.; Zhang, Y.; Peng, Z.; Zhou, F.; Ding, X.; Ye, Z. Impact of Underwater Noise on the Growth, Physiology and Behavior of *Micropterus Salmoides* in Industrial Recirculating Aquaculture Systems. *Environ. Pollut.* **2021**, *291*, 118152. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Fay, R. Soundscapes and the Sense of Hearing of Fishes. *Integr. Zool.* **2009**, *4*, 26–32. [\[CrossRef\]](#)
35. Popper, A.N.; Hastings, M.C. The Effects of Anthropogenic Sources of Sound on Fishes. *J. Fish Biol.* **2009**, *75*, 455–489. [\[CrossRef\]](#)
36. Levin, L.E.; Levin, A.F. Conditioning as an Aid to Fish Harvest. *Aquac. Eng.* **1994**, *13*, 201–210. [\[CrossRef\]](#)
37. Bratland, S.; Stien, L.H.; Braithwaite, V.A.; Juell, J.-E.; Folkedal, O.; Nilsson, J.; Oppedal, F.; Fosseidengen, J.E.; Kristiansen, T.S. From Fright to Anticipation: Using Aversive Light Stimuli to Investigate Reward Conditioning in Large Groups of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Aquac. Int.* **2010**, *18*, 991–1001. [\[CrossRef\]](#)
38. Zion, B.; Barki, A.; Grinshpon, J.; Rosenfeld, L.; Karplus, I. An Automatic Fishing Machine Based on Acoustic Conditioning. *Aquac. Eng.* **2011**, *45*, 87–91. [\[CrossRef\]](#)
39. Ellis, T.; Yildiz, H.Y.; López-Olmeda, J.; Spedicato, M.T.; Tort, L.; Øverli, Ø.; Martins, C.I.M. Cortisol and Finfish Welfare. *Fish Physiol. Biochem.* **2012**, *38*, 163–188. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Baßmann, B.; Brenner, M.; Palm, H.W. Stress and Welfare of African Catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) in a Coupled Aquaponic System. *Water* **2017**, *9*, 504. [\[CrossRef\]](#)

41. Mickle, M.F.; Higgs, D.M. Integrating Techniques: A Review of the Effects of Anthropogenic Noise on Freshwater Fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2018**, *75*, 1534–1541. [\[CrossRef\]](#)
42. Lindholm-Lehto, P. Water Quality Monitoring in Recirculating Aquaculture Systems. *Aquac. Fish Fish.* **2023**, *3*, 113–131. [\[CrossRef\]](#)
43. Ip, Y.K.; Chew, S.F.; Wilson, J.M.; Randall, D.J. Defences against Ammonia Toxicity in Tropical Air-Breathing Fishes Exposed to High Concentrations of Environmental Ammonia: A Review. *J. Comp. Physiol. B* **2004**, *174*, 565–575. [\[CrossRef\]](#)
44. Schram, E.; Roques, J.A.C.; Abbink, W.; Spanings, T.; De Vries, P.; Bierman, S.; De Vis, H.V.; Flik, G. The Impact of Elevated Water Ammonia Concentration on Physiology, Growth and Feed Intake of African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* **2010**, *306*, 108–115. [\[CrossRef\]](#)
45. Boerrigter, J.G.J.; Van Den Bos, R.; Van De Vis, H.; Spanings, T.; Flik, G. Effects of Density, PVC-Tubes and Feeding Time on Growth, Stress and Aggression in African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquac. Res.* **2016**, *47*, 2553–2568. [\[CrossRef\]](#)
46. Fernö, A.; Huse, G.; Jakobsen, P.J.; Kristiansen, T.S.; Nilsson, J. Fish Behaviour, Learning, Aquaculture and Fisheries. In *Fish Cognition and Behavior*; Brown, C., Laland, K., Krause, J., Eds.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp. 359–404. ISBN 978-1-4443-3221-6.
47. Deane, E.E.; Woo, N.Y.S. Modulation of Fish Growth Hormone Levels by Salinity, Temperature, Pollutants and Aquaculture Related Stress: A Review. *Rev. Fish Biol. Fish.* **2009**, *19*, 97–120. [\[CrossRef\]](#)
48. Van De Nieuwegiessen, P.G.; Boerlage, A.S.; Verreth, J.A.J.; Schrama, J.W. Assessing the Effects of a Chronic Stressor, Stocking Density, on Welfare Indicators of Juvenile African Catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2008**, *115*, 233–243. [\[CrossRef\]](#)
49. Bozhkov, A.; Nikolov, G.; Ürkü, Ç.; Zarpyanova, D.; Atanasoff, A.; Secer, F.S.; Kandir, S. Effect of Different Light Intensities on Prolactin and Cortisol Plasma Concentration in Farming African Catfish (*Clarias gariepinus*) in RAS with Low-Water Exchange. *Isr. J. Aquac.-Bamidgeh* **2023**, *75*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
50. López-Olmeda, J.F.; Noble, C.; Sánchez-Vázquez, F.J. Does Feeding Time Affect Fish Welfare? *Fish Physiol. Biochem.* **2012**, *38*, 143–152. [\[CrossRef\]](#)
51. Tymchuk, W.E.; Beckman, B.; Devlin, R.H. Altered Expression of Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor I Axis Hormones in Domesticated Fish. *Endocrinology* **2009**, *150*, 1809–1816. [\[CrossRef\]](#)
52. Reinecke, M.; Björnsson, B.T.; Dickhoff, W.W.; McCormick, S.D.; Navarro, I.; Power, D.M.; Gutiérrez, J. Growth Hormone and Insulin-like Growth Factors in Fish: Where We Are and Where to Go. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2005**, *142*, 20–24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Indriastuti, C.E.; Junior, M.Z.; Suprayudi, M.A.; Supriyono, E.; Alimuddin, A. Cannibalism, Survival and Growth Performance of Juvenile African Catfish *Clarias gariepinus* in Relation to Photoperiod and 17 β -Oestradiol Treatment. *Aquac. Res.* **2022**, *53*, 4437–4448. [\[CrossRef\]](#)
54. Reddy, P.K.; Leatherland, J.F. Does the Time of Feeding Affect the Diurnal Rhythms of Plasma Hormone and Glucose Concentration and Hepatic Glycogen Content of Rainbow Trout? *Fish Physiol. Biochem.* **1994**, *13*, 133–140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Nwanna, L.C. Nutritional Value and Digestibility of Fermented Shrimp Head Waste Meal by African Catfish *Clarias gariepinus*. *Pak. J. Nutr.* **2003**, *2*, 339–345. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



The role of light in the rearing of *Clarias gariepinus* larvae: Effects on behaviour, growth and survival

Marc-Christopher Hildebrand^{*}, Nina Hentrich, Harry Wilhelm Palm

Department of Aquaculture and Sea-Ranching, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, University of Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 6, Rostock 18059, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Aquaculture
light
fish ethology
fish production

ABSTRACT

The growth performance and behavior activity of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) larvae were examined under different light regimes. Larvae (average weight 0.095 g / length 2.28 cm) were reared in 50 L aquaria at a stocking density of 12 fish/L and challenged with red, yellow or blue light. In a second experiment, larvae from the same batch were challenged with different yellow light intensities of 0.07, 23.00 or 70.00 (W/m²/nm). Performance parameters were determined by fish counts as well as measuring the initial and final body weight. Video recordings were applied in order to evaluate ethological parameters. African catfish larvae were affected by different light spectra as seen in the number of lesions and swimming activity-, escape- and air-breathing behavior, where the subgroups with red and yellow color differed from the blue treatment. The swimming- and air-breathing activity were positively affected under low light intensities. The number of lesions also decreased under minimal illumination. The performance indicators feeding conversion rate (FCR), special growth rate (SGR) or the final mean weight were not affected by any light treatment. Fish mortality and growth performance were not significantly influenced by the respective light treatment, we therefore recommend that yellow and dimmed light is most suitable for the initial rearing of African catfish larvae with respect to improved fish welfare.

1. Introduction

Nowadays, fish as a food source is increasingly produced in aquaculture facilities in many countries around the world. In the last 20 years, 370.1 million tons were produced in aquaculture farms around the world, getting closer to the amounts of annually caught fish (Fisheries and Aquaculture Department, 2022). This brings the rearing conditions of aquaculture fish into the focus of customers and producers in order to increase productivity and product quality. In addition, fish hatcheries and farms in the aquaculture sector are being increasingly encouraged to place more emphasis on product quality and higher production success.

Tank coloration and spectral intensity are one of the parameters that can have a great impact on the cultivation of fish (Ullmann et al., 2011). Habitats, which were illuminated by different light spectra (white, green, yellow, red and blue), resulted in different fish survival and growth rates and also changes in behavior (Ullmann et al., 2011; Sallehudin and Mukai, 2014; Sallehudin et al., 2017). Many studies have shown the complex role light plays in fish life and reproduction, with the

ideal wavelength for fish development varying by species due to differences in visual sensitivity (Downing, 2002; Sierra-Flores et al., 2016; Radenko, 1991; Ruchin, 2004; Kawamura et al., 2015). Because African catfish (*Clarias gariepinus*) can distinguish colors (Fatollahi and Kasumyan, 2006), they can use their vision to select and hunt for prey even more effectively even by discrimination feed color (Lee et al., 2014). These capabilities and limitations underline the importance of light management in aquaculture farms when rearing and breeding fish, as this can have an impact on their development (Prokešová et al., 2017). Similarly light intensity might influence fish behavior, survival or growth. Previous studies on this topic indicated that survival rates could be much higher under lower daylight intensity (*Clarias gariepinus*, Mukai et al., 2013; *Pangasianodon hypophthalmus*, Mukai et al., 2015) compared to a regular daylight illumination.

One of the most commonly used species in aquaculture is the African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822). With its high growth rate and resilience, it is one of the most popular cultured fish today. Light experiments either with different spectra (Sallehudin et al., 2017) or intensities (Almazán-Rueda et al., 2004; Prokešová et al., 2017) were

^{*} Correspondence to: Justus-von-Liebig-Weg 2, Rostock D-18059, Germany.
E-mail address: marc-christopher.hildebrand@uni-rostock.de (M.-C. Hildebrand).

initially conducted in aquaculture, showing that the best growth rate of African catfish was under yellow light conditions (Sallehudin et al., 2017) or dark conditions (Appelbaum and McGeer, 1998). For this species, behavioral changes have also been observed at different light intensities (Almazán-Rueda et al., 2004; Almazán-Rueda et al., 2005; Sallehudin et al., 2014), including an increase in agonistic behavior and activity under high daylight intensities (Sallehudin et al., 2014). This suggests that optimal light intensity could be critical for juvenile growth under rearing conditions (Boeuf and Le Bail, 1999; Almazán-Rueda et al., 2005). Improved or adapted lighting conditions could therefore contribute to improved rearing conditions and better welfare, perhaps even improved growth or reduced mortality, for the millions of hatchery-reared African catfish every year in northern Germany (Pasch and Palm, 2021).

The present study aims to investigate the growth performance, survival and ethology of African catfish under different light regimes in order to determine a beneficial light regime for the growing catfish. African catfish larvae were either exposed to different colors (red, yellow or blue) all at the same spectral irradiance (100 W/m²/nm), or to yellow light at different spectral irradiances (0.07, 23.00, 70.00 W/m²/nm). Since spectral irradiance is linked to photon flux density, it influenced light intensity in the second experiment. At an irradiance of 0.07 W/m²/nm, the pool was significantly darkened; at 23.00 W/m²/nm, it had low illumination; and at 70.00 W/m²/nm, it was sufficiently illuminated (Table 1). We assumed beneficial cultivation conditions of African catfish larvae under yellow wave length and reduced light intensity.

2. Material and methods

2.1. Experimental design and system maintenance

To investigate behavioral changes under varying light regimes and intensities, two distinct experiments were conducted over 29 days each in an isolated and shaded experimental chamber at the University of Rostock's "Fish Glass House". In the first experiment (light quality Exp. A), different colors of red light (Red-100), yellow light (Yellow-100) and blue light (Blue-100) were tested with a spectral light intensity of 100 W/m²/nm (Table 1). The selection of the different light spectra was based on the study results of Ullmann et al. (2011), Sallehudin and Mukai (2014) and Salehudin (2017). In this context, the observed growth success under yellow light and the observed behavioral effects of red and blue light in farmed fish were taken into account beside other factors. The second experiment (light quantity Exp. B) focused on the spectral light intensity of the yellow light beginning with complete shadowed (Yellow-0) followed by a small (Yellow-15) and medium light intensity (Yellow-35). A measurement of the background radiation revealed 0.05 W/m²/nm. Both experiments were carried out in a closed recirculation system with nine tanks (Exp. A: L × W × H: 100 cm × 50 cm × 32 cm) and a sump (approx. 300 L each), resulting in a total volume of 1500 L (Fig. 1). For the experimental design, three aquaria were provided to each treatment group as replicates for each particular

lighting setting to evaluate the behavior and growth of the fish under each condition. Due to the small size of the fish the volume of the fish enclosures per tank was limited to about 50 L by using vertical filter mats (Fig. 2). To ensure a stable and uniform illumination of the aquaria, we used infinitely dimmable red-green-blue (RGB) light-emitting-diode (LED) bars (Solar Stinger SunStrip 70, Econlux GmbH, Germany) slavery controlled by an aquarium computer (Profilux 4, GHL, Germany) and controlled the set-up with a spectrometer (SCSS 45 & CSS-D, Gigahertz-Optik) (Table 1). The lighting times were then adjusted to an 8–16 hour daylight rhythm.

Water quality parameters (temperature, pH, dissolved oxygen (DO), electric conductivity (EC), and redox potential) were measured daily in a 2-hour period by using laboratory standardized sensor devices attached to the aquarium computer. Calibrations of the sensors were done in 10-day intervals or after invalid measurements. Chemical water parameters like nitrate (NO₃), nitrite (NO₂), ammonium (NH₄⁺), and orthophosphate (PO₄³⁻) were taken from the sump in a three-day interval and were analyzed by an autoanalyzer (Gallery™, automated Photometric Analyzer, Thermo Fisher Scientific). After 10 days, a volume of 120 L was automatically exchanged by the system to stabilize the nutrient concentrations inside the system.

For both experiments, 10,800 African catfish larvae were obtained from a restocking delivery by a local producer (PAL Aquaculture GmbH). The larvae of Exp. A (0.095 g mean weight, 2.28 cm mean length) and Exp. B (0.097 g mean weight, 2.36 cm mean length) were stocked in the 50 L enclosures into the nine tanks at a stocking density of 12 fish/L. All the fish were acclimatized for 2 days by low light intensities before they were exposed to the full intensity of the treatments. The fish were fed with a commercial catfish diet (Coppens Start Premium 0.3–1.5 mm). In order to avoid exceeding nutrient loads, the amount of total feed was calculated weekly in relation to the current biomass and set to 3 % of the mean body weight in four feeding events per day (0, 6, 12, and 18 pm). During the experimental period of 29 days, in Exp. A 746 g per tank were fed, whereas in Exp. B 836 g were fed (Table 4). This results in a total biomass of 69.20 g and a daily feeding rate of 0.45 g in a single tank for Exp. A, while for Exp. B was fed a daily feeding rate of 0.48 g with a total biomass of 64.17 g for a single tank.

The feed conversion ratio (FCR) was calculated:

TFI = total feed intake (g)

W₁ = Initial fish weight (g)

W₂ = Final fish weight (g)

$$\frac{TFI}{(W_1 - W_0)} = FCR \quad (1)$$

The specific growth rate (SGR %/d) was calculated:

t₀ = Date of the beginning

t₁ = Date of the ending

W₁ = Initial fish weight (g)

W₂ = Final fish weight (g)

$$\frac{(\ln(W_1) - \ln(W_2)) * 100}{(t_1 - t_0)} = SGR(\frac{\%Bw}{d}) \quad (2)$$

$$\frac{n_{dead}}{n_0} * 100 = Mo(\%) \quad (3)$$

Mortality Mo (%) was calculated:

n₀ = Initial number of fish

n_{dead} = Number of dead fish

$$Bw_f - Bw_i = Growth(g) \quad (4)$$

Growth (g) was calculated:

Bw_i = Mean initial body weight

Bw_f = Mean final body weight

The weight and length of all fish were measured at the beginning and the end of both experiments. Interim measurements were carried out on

Table 1

Evaluation of the illumination settings of light spectrum- (Exp. A) and light intensity experiment (Exp. B) by used spectrometer (SCSS 45 & CSS-D, Gigahertz-Optik, Germany).

Regime	Wavelength (λ/nm)	Spectral irradiance of wavelength (W/m ² /nm)	Illuminance (Lx) Ev
Red-100	632	100.00	338.4
Yellow-100	581	100.00	624.6
Blue-100	455	100.00	187.8
Yellow-0	-	0.07	0.7
Yellow-23	581	23.00	174.0
Yellow-70	581	70.00	647.0

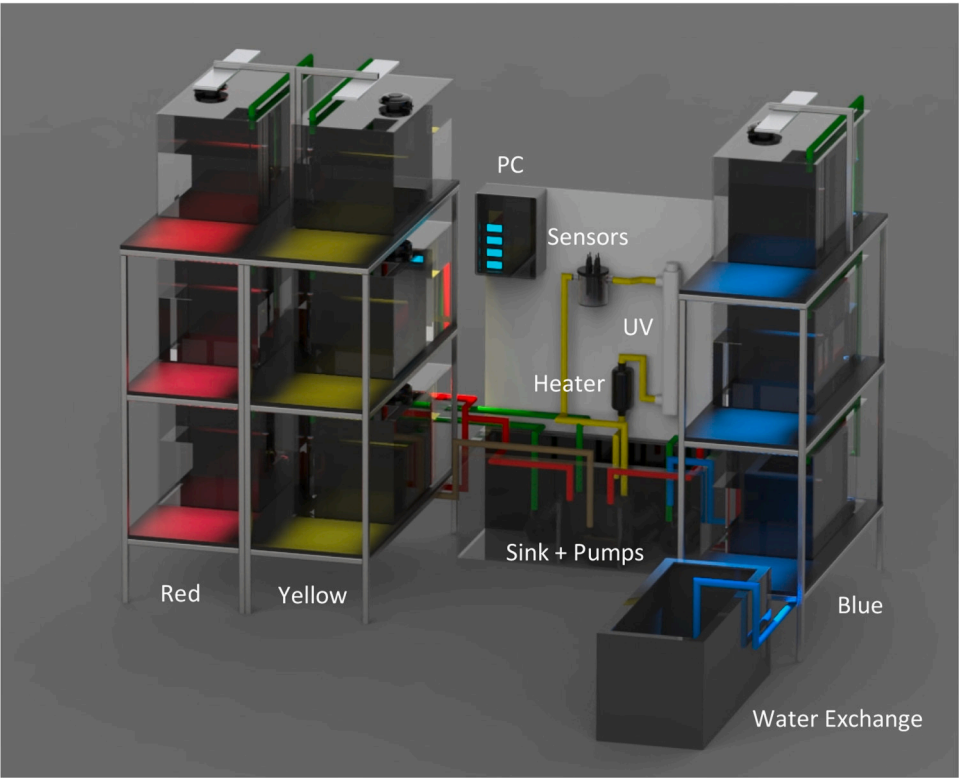


Fig. 1. Experimental set-up (Exp. A). Three treatment groups (red, yellow and blue light) with 3 tanks each in a recirculating water system. Pump-sump (middle) and automated water exchange system (front). Modified after [Wenzel et al. \(2022\)](#).

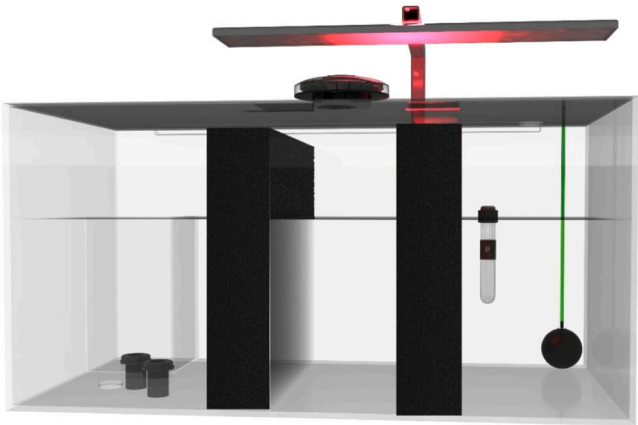


Fig. 2. Habitat set-up. 160 L tank with 50 L fish enclosure limited by two filter mats. Illuminated and equipped by red-green-blue-light-emitting-diodes (RGB-LED), heating system, air-supply and feeding automation.

days 8, 15 and 22 with a subsample of 100 fish per tank in order to calculate the mean weight for feed adjustment calculations and condition factors. Shooters and cannibals were separated from the swarms into an unstocked part of a respective tank, when they had doubled their biomass in relation to the respective average weight of a certain tank. Later, those fish were reintroduced to their swarm at the end of the experiment. After 29 days, all surviving fish were killed by freezing in ice and their wound status was accurately checked by counting the bitemarks on the skin surface. All animal treatments were carried out in accordance with the guidelines for animal experiments of the European Union (EU) and were approved by the relevant ethics committee.

Video recordings were used to identify possible effects of varying light conditions on the fish ethology. Recordings were captured for

20 min on days 3, 10, 17, and 24 by using a standard rotating box model to establish a systematic recording structure over the periodic recording events. This approach allowed for simultaneous recording of three tanks from different groups, which were rotated in sequence during each session. For each recording, the first five minutes were not evaluated to exclude anthropogenic influences (placement of the camera or movement in front of the tanks, etc.). In order to evaluate different behavioral patterns, we used a modified ethogram by [Van de Nieuwegiessen et al. \(2008\)](#) and [Hildebrand et al. \(2023\)](#) (Table 2). The respective activity of the fish in a tank was calculated based on all swimming and resting fish which were visible during a five-minute interval and then referred to the total number of fish inside the tank.

Statistics:

Statistical analyses were conducted by using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 27.0 (IBM Corp., 2020, Armonk,

Table 2
Ethogram for direct observations and video recordings ([Van de Nieuwegiessen et al., 2008](#)). Definitions used to evaluate potential effects of light settings on fish behavior.

Behavioral element	Definition
Agonistic behavior	Chasing or biting a fish, or getting chased upon or bitten by another fish.
Air-breathing	The fish moves to the water surface and takes a gulp of air. This was checked by escaping air from the gills of the fish, when it was swimming back to the bottom of the tank.
Escape attempts	The fish moves to the water surface and its head emerges from the water surface for at least past its gill cover.
Resting	Moving passively through the water or lying still at the bottom of the tank.
Stereotypic behavior	Continuous and compulsive swimming under a fixed, repetitive pattern.
Swimming	A displacement of the body, while browsing, moving, eating and air-breathing.

NY, USA). All data were first tested on their normal distribution and homogeneity of variances by Shapiro and Levanés tests. Subsequently, normal distributed data with homogeneous variances were further analyzed by a one-way ANOVA. For data with inhomogeneous normal distribution or variances, a Kruskal-Wallis test or Welch's - ANOVA was used for evaluation. If significances were calculated (<0.05), the post-hoc tests Tukey-HSD (ANOVA) and Dunnet-T3 (Kruskal-Wallis) were conducted.

3. Results

3.1. Water analyses

The mean physiological and chemical water parameters are shown in Table 3. Temperatures were stable between 28.3 and 29.6 °C. The pH values were kept in a normal range of about 7 pH and did not fall below that value. In both experiments, the oxygen saturation (DO) was between 7 and 8 mg/L and fulfilled the general needs of fish in an aquatic system. The redox potential and electron conductivity (EC) were slightly different between the experiments, because of a higher amount of organic waste (Exp. A) and due to a different amount of total feed fed to the fish (Exp. B). In both experiments, the chemical parameters such as the concentrations of NH_4^+ , NO_3^- and NO_2^- ranged from 0.09 to 1.81 mg/L, 147.90–171.90 mg/L and 0.07–0.12 mg/L, respectively. Since the concentrations of NH_4^+ and NO_2^- were consistently low, the effectiveness of bacterial activity in the biofilter was confirmed. The nutrient concentrations of PO_4^{3-} in Exp. A and B differed between 1.20 and 9.20 mg/L as they were affected by the respective feed intake in each system and also considerably by feed wastage in Exp. B. As the different nutrient concentrations were quite stable over time, this observation can be explained by the regular water exchange in this closed recirculation system.

3.2. Growth and mortality

The initial weights and lengths of the fish were similar in both experiments ($p>0.05$), while the final weights differed significantly between the Yellow-100 and Blue-100 treatments at the end of Exp. A (Kruskal Wallis test, $p=0.041$). The total amount of feed fed to a given system was also not significantly different (Table 4). The growth of individual fish in each experiment indicated that larvae in the Yellow-100 treatment grew significantly differently from those in the Blue-100 treatment group (ANOVA, Tukey-HSD, $p=0.016$). In contrast, the feeding conversion rate (FCR) and specific growth rate (SGR) values calculated across the experiments showed no significant differences. Fish that were wounded or fast-growing were counted and ranged between 27 and 48 (Exp. A) and 53–125 (Exp. B) or 15–24 (Exp. A) and 10–14 (Exp. B) individuals across treatment groups respectively. Mortality of larvae from both experiments ranged from 46.06 % to 57.83 % (Exp. A) and 45.80–62.50 % (Exp. B), with no significant difference

Table 3
Mean water parameters ($\pm$ standard error (SE); $n=29$) of Exp. A and Exp. B. of temperature (°C), dissolved oxygen (DO), electro conductivity (EC), redox-value (mV), pH-value (pH) and chemical compounds (mg/L).

Parameters		Exp. A Value $\pm$ SE	Exp. B Value $\pm$ SE
Temp.	(°C)	29.66 $\pm$ 0.07	28.30 $\pm$ 0.12
DO	(mg/L)	7.15 $\pm$ 1.28	8.28 $\pm$ 0.43
EC	($\mu\text{S}/\text{cm}$)	439.22 $\pm$ 12.26	643.67 $\pm$ 3.58
Redox	(mV)	272.93 $\pm$ 8.51	67.50 $\pm$ 1.42
pH		7.34 $\pm$ 0.13	8.04 $\pm$ 0.04
NO_3^-	(mg/L)	171.99 $\pm$ 29.25	147.97 $\pm$ 16.19
NO_2^-	(mg/L)	0.12 $\pm$ 0.08	0.07 $\pm$ 0.01
PO_4^{3-}	(mg/L)	1.20 $\pm$ 0.16	9.23 $\pm$ 1.47
NH_4^+	(mg/L)	1.81 $\pm$ 1.01	0.09 $\pm$ 0.00

Table 4
Mean growth and mortality ($\pm$ standard deviation (SD)) of *C. gariepinus* larvae exposed to different light regimes. General growth parameters including feed conversion rate (FCR) and specific growth rate (SGR).

	Exp. A			Exp. B		
	Red-100	Yellow-100	Blue-100	Yellow-0	Yellow-23	Yellow-70
Initial weight (g)	0.13 $\pm$	0.11 $\pm$	0.11 $\pm$	0.10 $\pm$	0.11 $\pm$	0.11 $\pm$
Final weight (g)	0.04	0.02	0.03	0.23	0.03	0.04
Initial length (cm)	1.45 $\pm$	1.38 $\pm$	1.56 $\pm$	2.26 $\pm$	1.95 $\pm$	2.10 $\pm$
Final length (cm)	0.02	0.08 a	0.05 b	0.98	0.80	0.88
Total feed input (g)	2.13 $\pm$	2.05 $\pm$	2.01 $\pm$	2.38 $\pm$	2.39 $\pm$	2.39 $\pm$
Growth [g fish^{-1}]	0.29	0.18	0.20	0.23	0.25	0.25
FCR [g g^{-1}]	4.96 $\pm$	4.85 $\pm$	5.30 $\pm$	6.76 $\pm$	6.36 $\pm$	6.31 $\pm$
SGR [% day $^{-1}$]	0.71	0.79	0.78	0.98	0.93	0.92
Wounded [n]	733.14	728.26	777.04	772.19	894.39	844.05
Fast Grower [n]	1.32 $\pm$	1.27 $\pm$	1.45 $\pm$	1.33 $\pm$	1.54 $\pm$	1.44 $\pm$
Mortality in % (n)	0.03	0.09 a	0.03 b	0.14	0.12	0.15
	0.33 $\pm$	0.34 $\pm$	0.32 $\pm$	0.33 $\pm$	0.33 $\pm$	0.33 $\pm$
	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
	9.04 $\pm$	8.87 $\pm$	9.31 $\pm$	8.63 $\pm$	8.24 $\pm$	8.42 $\pm$
	0.05	0.21	0.12	0.26	0.20	0.27
	48	27	42	56	53	125
	16	15	24	11	14	10
	50.67 $\pm$	46.06 $\pm$	57.83 $\pm$	62.50 $\pm$	45.80 $\pm$	51.11 $\pm$
	$\pm$ 1.59	16.28	$\pm$ 8.93	7.37	4.60	10.68

Note: Data with significant differences ($p<0.05$) have been marked with different superscripts (Kruskal Wallis test or ANOVA and Tukey-HSD).

between treatments. However, the mean values of the experimental groups with yellow illumination in Exp. A (46.06 ± 16.28) and with minimal illumination intensity in Exp. B (45.80 ± 4.60) showed the lowest mortality values within the experiments but remaining without any significance.

3.3. Fish behavior

Significant differences were found in the swimming activity, air-breathing-, agonistic- and escape behavior of the fish from the different treatment groups. No significances were seen in stereotypic behaviour under the respective treatments of a certain experiment (Table 5). Most interesting behavioral effects (swimming activity and air breathing) from the light quality experiment (Exp. A) and the light quantity experiment (Exp. B) are summarized by Fig. 3.

On the 3rd day of Exp. A, the swimming activity significantly increased in the Red-100 and Yellow-100 illuminated treatments compared with the Blue-100 treatment group. At the same time, significant differences in air-breathing activity among all treatments were also noted (Fig. 3). Fish under the Blue-100 light treatment displayed notably higher agonistic behavior and more escape attempts than those in the Red-100 and Yellow-100 treatment groups (Table 5). The results of the 10th day also confirmed the significant differences in swimming activity between the Blue 100 and Yellow 100 treatment groups. As air-breathing behaviour was seen to be dominantly performed in the (Blue-100) treatment group, this effect was also recognized to be significant at day 17 and 24 during Exp. A (Fig. 3). In the light quantity experiment (Exp. B), significant differences were predominantly found in swimming activity. Here, the highest activity was observed in the Yellow-0 treatment and differed significantly to those of Yellow-23 and Yellow-70 at day 3, 10, 17 and 24 (Fig. 3). Further significant effects of Exp. B were found in air-breathing behaviour, where the Yellow-0 treatment differed significantly to the Yellow-23 treatment at day 3 and the Yellow-70 to both the Yellow-0 and Yellow-23 treatment at day 24 (Table 5).

Table 5

Mean behavioral responses ($\pm$ standard deviation) of *C. gariepinus* larvae from (Exp. A) and (Exp. B) (both with $n=3$) exposed to different light regimes. Index values have been calculated by dividing the sampling numbers against the actual number of fish in a certain.

Video and direct observations	Exp. A			Exp. B		
	Red-100	Yellow-100	Blue-100	Yellow-0	Yellow-23	Yellow-70
Swimming activity (Total events) day 3	414.33 $\pm$ 31.65 a	437.33 $\pm$ 31.66 a	302.33 $\pm$ 25.57 b	557.00 $\pm$ 40.51 a	222.67 $\pm$ 123.23 b	297.67 $\pm$ 35.84 b
Swimming activity (Total events) day 10	237.33 $\pm$ 69.21	329.00 $\pm$ 26.05 a	201.66 $\pm$ 25.50 b	469.00 $\pm$ 40.26 a	216.67 $\pm$ 4.93 b	335.00 $\pm$ 27.62 c
Swimming activity (Total events) day 17	271.00 $\pm$ 30.78	265.66 $\pm$ 61.98	179.33 $\pm$ 71.81	424.00 $\pm$ 52.12 a	250.67 $\pm$ 33.20 b	270.00 $\pm$ 40.95 b
Swimming activity (Total events) day 24	222.00 $\pm$ 6.24	258.66 $\pm$ 44.50	194.66 $\pm$ 29.87	362.33 $\pm$ 18.15 a	185.00 $\pm$ 8.00 b	177.33 $\pm$ 24.54 b
Escape attempts (Total frequency) day 3	0.005 $\pm$ 0.004 a	0.008 $\pm$ 0.001 a	0.021 $\pm$ 0.007 b	0.005 $\pm$ 0.002	0.025 $\pm$ 0.12	0.008 $\pm$ 0.005
Escape attempts (Total frequency) day 10	0.003 $\pm$ 0.001	0.008 $\pm$ 0.007	0.025 $\pm$ 0.008	0.007 $\pm$ 0.001	0.015 $\pm$ 0.002	0.008 $\pm$ 0.005
Escape attempts (Total frequency) day 17	0.021 $\pm$ 0.011	0.007 $\pm$ 0.012	0.029 $\pm$ 0.026	0.008 $\pm$ 0.003	0.022 $\pm$ 0.002	0.013 $\pm$ 0.010
Escape attempts (Total frequency) day 24	0.002 $\pm$ 0.003	0.007 $\pm$ 0.002	0.019 $\pm$ 0.014	0.009 $\pm$ 0.005	0.024 $\pm$ 0.025	0.022 $\pm$ 0.009
Air-breathing Index (Total frequency) day 3	0.099 $\pm$ 0.010 a	0.148 $\pm$ 0.019 b	0.254 $\pm$ 0.22 c	3.627 $\pm$ 0.431	7.587 $\pm$ 5.939	4.685 $\pm$ 0.257
Air-breathing Index (Total frequency) day 10	0.106 $\pm$ 0.013 a	0.167 $\pm$ 0.010 a	0.345 $\pm$ 0.082 b	3.320 $\pm$ 1.093 a	6.238 $\pm$ 0.724 b	4.162 $\pm$ 0.982
Air-breathing Index (Total frequency) day 17	0.149 $\pm$ 0.073 a	0.111 $\pm$ 0.053 a	0.334 $\pm$ 0.082 b	4.095 $\pm$ 0.852	7.774 $\pm$ 0.431	8.264 $\pm$ 1.166
Air-breathing Index (Total frequency) day 24	0.286 $\pm$ 0.242	0.147 $\pm$ 0.007	0.370 $\pm$ 0.088	4.764 $\pm$ 1.707 a	7.069 $\pm$ 1.553 a	14.230 $\pm$ 2.455 b
Agonistic behavior Index (Total frequency) day 3	0.001 $\pm$ 0.001 a	0.002 $\pm$ 0.001	0.004 $\pm$ 0.001 b	0.002 $\pm$ 0.001	0.001 $\pm$ 0.002	0.002 $\pm$ 0.003
Agonistic behavior Index (Total frequency) day 10	0.001 $\pm$ 0.001	0.004 $\pm$ 0.000	0.005 $\pm$ 0.001	0.001 $\pm$ 0.002	0.003 $\pm$ 0.002	0.006 $\pm$ 0.005
Agonistic behavior Index (Total frequency) day 17	0.004 $\pm$ 0.004	0.008 $\pm$ 0.003	0.006 $\pm$ 0.004	0.005 $\pm$ 0.005	0.002 $\pm$ 0.002	0.006 $\pm$ 0.008
Agonistic behavior Index (Total frequency) day 24	n.a.	0.002 $\pm$ 0.002	0.002 $\pm$ 0.001	n.a.	0.002 $\pm$ 0.003	0.002 $\pm$ 0.003
Stereotypical behavior Index (Total frequency) day 3	0.002 $\pm$ 0.003	n.a.	n.a.	2.68 $\pm$ 1.16	5.03 $\pm$ 1.01	2.70 $\pm$ 1.52
Stereotypical behavior Index (Total frequency) day 10	0.001 $\pm$ 0.008	0.003 $\pm$ 0.008	0.004 $\pm$ 0.002	3.68 $\pm$ 0.57	3.76 $\pm$ 0.63	3.03 $\pm$ 1.99
Stereotypical behavior Index (Total frequency) day 17	n.a.	0.006 $\pm$ 0.006	0.002 $\pm$ 0.003	3.69 $\pm$ 1.53	5.74 $\pm$ 1.16	3.75 $\pm$ 2.53
Stereotypical behavior Index (Total frequency) day 24	n.a.	0.013 $\pm$ 0.022	n.a.	3.35 $\pm$ 2.06	4.71 $\pm$ 4.74	4.08 $\pm$ 0.99

Note: Data with significant differences ($p < 0.05$) have been marked with different superscripts according to ANOVA / Welch-ANOVA and Tukey-HSD.

4. Discussion

4.1. Water quality

Physical water parameters (temperature, oxygen saturation (DO), pH, electron conductivity (EC) and redox potential) were measured beside classic chemical parameters (NO_3^- , NO_2^- , and NH_4^+) in both experiments and ranged between 28.30 and 29.60 °C, 7.15–8.28 mg/L DO, 7.34–8.04 pH, 439.22–643.67 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 67.50–272.93 mV and 147.97–171.99 mg/L NO_3^- , 0.07–0.12 mg/L NO_2^- , 0.09–1.81 mg/L NH_4^+ respectively. Because the African catfish originates from mud-rich African lakes and habitats with low- oxygen levels and nutrient-rich waters, it tolerates a wide range of aquatic water quality parameters. *C. gariepinus* can tolerate temperatures between 18 – 32 °C albeit the optimal temperature range for its development and growth is between 27 and 30 °C (Britz and Hecht, 1987; Păpuc et al., 2019). Oxygen saturations and pH values can also be tolerated by the catfish between 3 and 6 mg/L (Saleh, 2020) and 5–9 pH (Ndubuisi et al., 2015). The EC and Redox values can vary between 100 and 2000 μS and up to +124.50 mV (Knaus and Palm, 2017; Palm et al., 2018; Suhl et al., 2018; Baßmann et al., 2020; Homoki et al., 2021). Concerning its resilience against high chemical water parameters like NO_3^- , NO_2^- , and NH_4^+ , this fish can tolerate levels of 620.1 mg/L (10 mM NO_3^- , Schram et al., 2014), 0.60 mg/L (43 μM NO_2^- , Roques et al., 2015; Knaus et al., 2020) and 8.8 mg/L NH_4^+ (Eding and Kamstra, 2001). All measured water parameters during both experiments are within the regular range for this fish species and consequently have not affected the larvae performance in the present study. Since it is conceivable that a set light spectrum can affect the water quality via its provoked behavior or feed consumption, this should be investigated again within a separated system as this connection could not be investigated in the system used in the course of both light experiments.

4.2. Growth performance and mortality

African catfish larvae were reared in aquaria with constant water exchange, since their growth and mortality are supposed to be more stable compared to static systems, and a natural percentage of larvae regularly die during the first few weeks after hatching (Romanova et al., 2020). Because the mortality ranged between 46.06 % and 62.50 % without any significant effects among the treatment groups, neither the light spectra nor the used light intensities had a significant impact on it. The mortality can therefore be described as being within the natural range for this fish and are comparable to the values of Kaiser et al. (1995) and Romanova et al. (2020). The only tentative observation is the lowest mean mortality value in the Yellow-100 light group while the Blue-100 light group had the highest value.

The values of final weight, FCR and SGR showed no significant differences between the treatment groups of light quality (spectra) or light quantity (intensities) (Table 4). Notably, the measured final weights of the treatment groups were highest in the blue-lighted treatments of the light quality experiment and in the shadowed treatments of the light quantity experiment. Additionally, blue-lighted treatments of the light quality experiment also exhibited a higher SGR. The FCR and SGR values from the current experiments can therefore be compared to studies by Almazán-Rueda et al. (2005), which examined catfish weighing 69.20 g, and Sallehudin et al. (2017), which studied catfish with a length of 26.0 mm, as light treatments did not significantly affect them. The observed differences in the SGR and the final weight in both experiments can be explained by the presence of some fish with cannibalistic behavior. Since they reduce the number of individuals and accumulate feed resources, their growth can be inhomogeneous and they become confounding factors in larvae experiments (Wenzel et al., 2022). However, cannibalism was not considered as an additional factor and might be evaluated in future experiments.

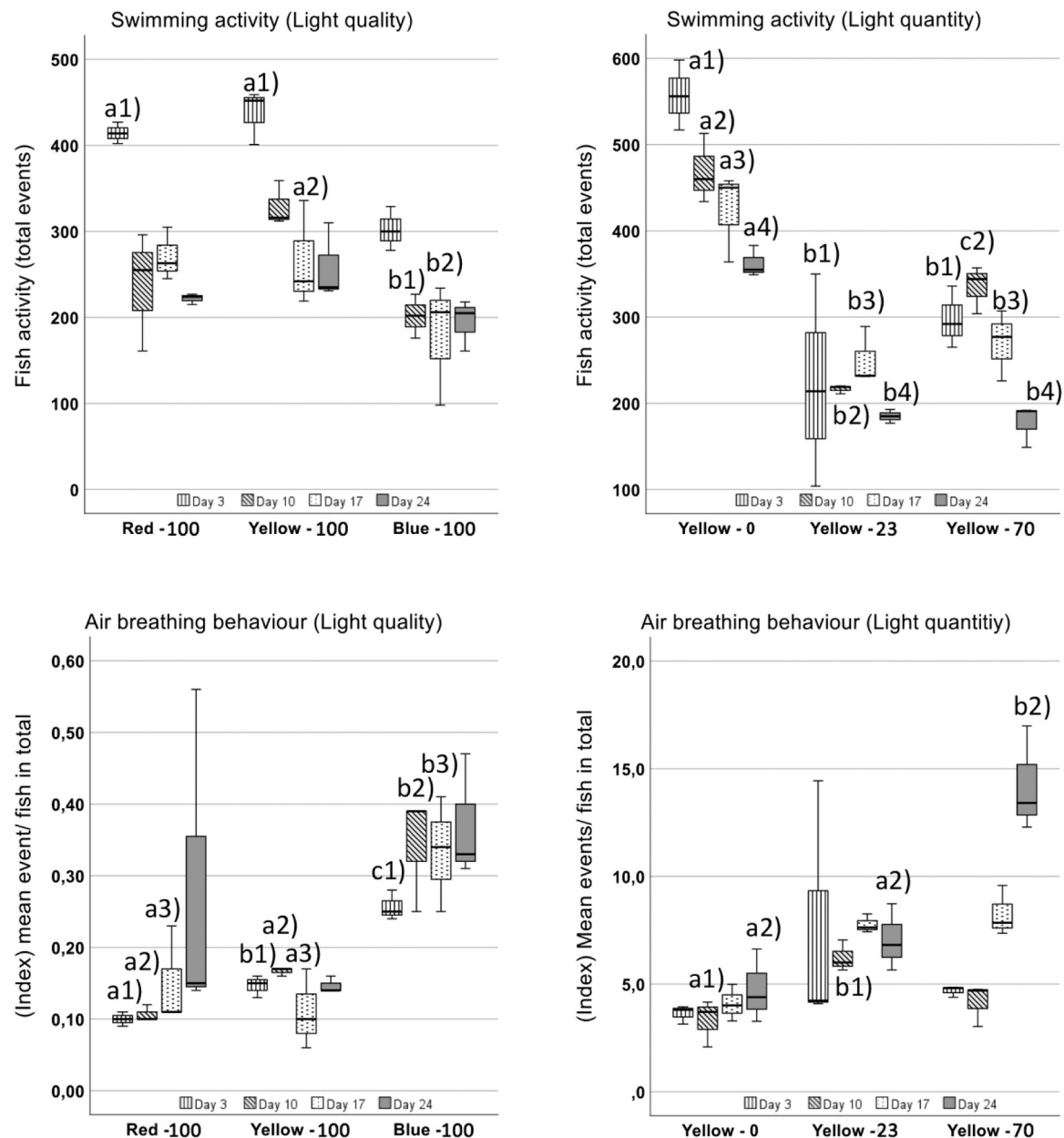


Fig. 3. Illustrated above are the results of swimming activity and air breathing behavior on experimental days (from left to right) 3, 10, 17 and 24 under different light quality (Exp. A) and light quantity (Exp. B) treatments. Significances are shown with different superscripts (a1, a1, b1= yellow-0 and yellow-23 differ significantly from yellow-70) in a specific boxplot.

4.3. Physiological and behavioral responses

Skin-lesions of the fish were most abundant in the red-lighted (Red-100) treatment groups in the light quality experiment and at the brightest light intensity (Yellow-70) in the light quantity experiment. Fewer lesions were seen in treatment groups with yellow light (Yellow-100) and with minimum or shadowed light intensity (Yellow-0, Yellow-23) among the treatments of the two experiments. Since the number of wounds can also affect fish growth, the fish from the Red-100 and Yellow-70 treatments may have been affected by their high number of wounds, which would result in a lower growth rate of the damaged fish. In fact, the fish from the Red-100 treatment showed a lower growth rate, but this effect was not seen in brighter light treatments of the light intensity experiment, which had considerably more wounds than the dimmed. Since in the current study the bite wounds on the fish were only caused by the behavior of the fish among themselves, other sources of

injuries are not indicated. The number of wounds in the light quantity experiment were measured 44 % higher under brighter illuminated conditions, compared with those who were kept under shadow. This indicates for the first time that the dependence on the light intensity of the catfish is more pronounced than on the type of color selected for the illumination in a particular tank. These findings correspond to [Almazán-Rueda et al. \(2004\)](#) and [Solomon and Okomoda \(2012\)](#), who investigated catfish juveniles with a corresponding weight of 69.2 g and 9.92 g and found a correlation between the number of bite wounds and higher light intensities or photoperiods.

As light plays an important role to fish that lives in shaded and covered habitats, the different treatments of light conditions strongly impacted certain behavioral pattern in the African catfish larvae. Treatment groups with different light colors have an effect on fish-related behavioral patterns such as swimming activity, escaping, air-breathing activity or agonistic behavior ([Sallehudin et al., 2014](#)).

Behavioral patterns have been reported before as potential indicators of chronic stress responses for African catfishes by Van de Nieuwegiesse et al. (2008), Isaac et al. (2017) and Ojelade et al. (2022). As they investigated behavioral reactions by *Clarias gariepinus* with total corresponding weight of 10.00 g, 7.35 g and 31.65 g their results are comparable to the results of the present study. In the present study, we found significant impacts of swimming activity, escaping and air-breathing between the red-yellow and the blue treatment groups ($p < 0.05$). Since tanks with blue light color had a significant higher escape and air-breathing activity, we assume therefore a higher stress exposure to the fish. However, the stress reaction and its amplitude should be measured more precisely by specific methods like cortisol or enzyme analysis in further experiments to determine the respective stress level under a certain light regime. In terms of fish growth under the tested light spectra, significantly higher growth rates were achieved in the Blue-100 tanks at the expense of fish welfare. If we consider the welfare indicators like wounding and behavioral activity, the Yellow-60 treatments had the best stocking quality for the fish but also having a minor growth rate. This indicates that growth and species-specific behavior of African catfish are independently dependent. For *C. gariepinus*, higher growth rates were achieved in the blue and red light spectra, but these were also associated with increased stress responses and more bite marks.

During the light quality experiment, the African catfish demonstrated comparatively lower growth performance, which was linked to more favorable behavioral activity and fewer bite marks. As we found African catfish also responding to different light intensities, the juvenile swimming activity was more prominent in the fully shaded habitat compared to those with low and medium light intensities. This finding contradicts the results of Almazán-Rueda et al. (2004), which reported higher swimming activity for African catfishes with a body weight of 55 g under higher light intensities (150 Lx), although it is not clear if the fish were foraging or stressed. Furthermore, higher illumination of the respective aquaria had an impact on the air-breathing activity, because the fish in the Yellow-23 and Yellow-70 group were significantly more active at day 10 and 24 respectively (Fig. 3). Previous studies have described that air-breathing activity correlates with higher levels of the stress hormone cortisol and can be therefore a potential additional indicator for chronic stress (Van de Nieuwegiesse et al., 2009), implying that higher lighting intensities cause stress to growing African catfish (Tucker, 1998). With regards to the growth rates noted in the light intensity experiment, more pronounced growth was also observed in the fish kept in illuminated tanks. Since wounding and unfavorable behaviors were more pronounced under brighter light conditions without affecting the growth rate of the fish significantly, we would still recommend that breeders of African catfish keep their fish under reduced light conditions to address the indicators of poor welfare.

Since in some fish species an appropriate light treatment can have a positive effect on the behavioral activity of the fish, stress household and their growth performance (Boeuf and Le Bail, 1999); (*Clarias gariepinus*, Almazán-Rueda et al., 2004; Tinca tinca, Owen et al., 2010), we conclude that the optimal growth rates and behavioral activities in both experiments of this study indicate an independence of the positive growth and welfare indicators (behaviour, wounding) for the African catfish. Both factors also appeared to be positively or negatively influenced by the stress situation to which the fish were exposed either by the light treatment or by additional underestimated factors such as cannibalism. We nevertheless found positive fish growth and better welfare parameters (wounds, behavioral activity) in light-dimmed fish tanks (Yellow-23) and comparatively weaker fish growth and poor welfare parameters in highly illuminated fish tanks (Yellow-70, Yellow-100) in both light experiments. Previous studies (Silurus glanis, Pohlmann et al., 2001; *Clarias gariepinus*, Adewolu et al., 2008) have highlighted the beneficial effects of low light and short photoperiods in catfish culture. Considering these findings alongside our current results, we recommend using low-intensity yellow light (23.00 W/m²/nm) for raising African

catfish larvae weighing between 0.095 and 2.30 g. This approach, at stocking densities of around 12 fish/L, can enhance animal welfare by reducing bite wounds and negative behaviors while maintaining an acceptable growth rate.

5. Conclusions

Our results demonstrate that growth and mortality of early African catfish larvae were unaffected by different light spectra or intensities, whereas the fish's behavior and wound numbers were negatively affected by higher light intensities (Yellow-70) or a red- or blue light spectrum. Reduced negative effects (number of wounds and behavioral activity) were found to be partially significantly affected under the yellow light spectrum (Yellow-100) and under minimally shaded light intensities (Yellow-23), suggesting better conditions for African catfish breeders under these treatments. Probably rearing catfish under dimmed yellow light could also have an effect on cannibalism, as fewer wounds occur and potential cannibalistic activity in the tanks could be lower. Therefore, this study supports the thesis of the negative phototaxis of African catfish (*C. gariepinus*) to daylight and intense illuminations (Appelbaum and McGeer, 1998; Pohlmann et al., 2001; Adewolu et al., 2008), but for the first time claims the recommendation that yellow-light with low intensity shows beneficial properties in terms of better fish welfare for rearing African catfish larvae in its early stages.

Hatcheries that breed African catfish with dimmed yellow light could therefore reduce the stress potential of the reared fish by reducing air breathing and improving swimming activity, while strengthening the health of the fish by reducing wounds at the same time. By reducing also stress, this is likely to have a direct positive effect on food intake and continued growing success. As the rapid growth of African catfish larvae is known to farmers, the benefit of appropriate light treatment for growing catfish is to reduce mortality and the number of injured fish in a tank. This protection helps prevent cannibalism, improves animal health, and enhances the production results of a fish hatchery.

Author Contributions

The authors of this article made the following contributions: conceptualization, M.C.H.; methodology, M.C.H.; validation, M.C.H. and N.H.; formal analysis, M.C.H. and N.H.; investigation, M.C.H. and N.H.; resources, M.C.H.; data curation, M.C.H. and N.H.; writing – original draft preparation, M.C.H.; writing – review and editing, M.C.H. and H.W.P.; visualization, M.C.H., supervision H.W.P.; project administration, M.C.H.; and funding acquisition, H.W.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This study was funded by the project "Performance and process water management in commercial (integrated) aquaculture systems with African catfish (*Clarias gariepinus*) in Mecklenburg-Western Pomerania" (MV-II.1-LM-007: 139030000103, EMFF: 7302).

Author Statement

We have included the comments of the reviewers in our revised version of our manuscript and prepared the Word file in correction mode for your acceptance. This can be checked by the reviewers. If you require a file without highlighted corrections, please use the file "Revised Manuscript without track-changes". If you have any questions or comments, please do not hesitate to contact us.

We hope that you like our changes.

CRediT authorship contribution statement

Nina Hentrich: Investigation. Harry Wilhelm Palm: Writing –

review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Marc-Christopher Hildebrand:** Writing – original draft, Visualization, Software, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Marc-Christopher Hildebrand reports financial support was provided by European Maritime and Fisheries Fund. Prof. Harry W. Palm reports a relationship with European Maritime and Fisheries Fund that includes: funding grants. The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of the data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Acknowledgments

We thank Erwin Berchtold for supply in graphical design. We thank Lisa Carolina Wenzel, Lu Xu, and Laura Ballesteros Redondo (Department of Aquaculture and Sea-Ranching, University of Rostock) for their assistance during samplings.

Data Availability

Data will be made available on request.

References

- Adewolu, M.A., Adeniji, C.A., Adejobi, A.B., 2008. Feed utilization, growth and survival of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) fingerlings cultured under different photoperiods. *Aquaculture* 283 (1–4), 64–67. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.020>.
- Almazán-Rueda, P., Schrama, J.W., Verreth, J.A., 2004. Behavioural responses under different feeding methods and light regimes of the African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. *Aquaculture* 231 (1–4), 347–359. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.016>.
- Almazán-Rueda, P., Van Helmond, A.M., Verreth, J.A.J., Schrama, J.W., 2005. Photoperiod affects growth, behaviour and stress variables in *Clarias gariepinus*. *J. Fish. Biol.* 67 (4), 1029–1039. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00806.x>.
- Appelbaum, S., McGeer, J.C., 1998. Effect of diet and light regime on growth and survival of African catfish (*Clarias gariepinus*) larvae and early juveniles. *Aquac. Nutr.* 4 (3), 157–164. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1998.00064.x>.
- Baßmann, B., Harbach, H., Weißbach, S., Palm, H.W., 2020. Effect of plant density in coupled aquaponics on the welfare status of African catfish, *Clarias gariepinus*. *J. World Aquac. Soc.* 51 (1), 183–199. <https://doi.org/10.1111/jwas.12574>.
- Boeuf, G., Le Bail, P.Y., 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* 177 (1–4), 129–152. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00074-5).
- Britz, P.J., Hecht, T., 1987. Temperature preferences and optimum temperature for growth of African sharp-tooth catfish (*Clarias gariepinus*) larvae and postlarvae. *Aquaculture* 63 (1–4), 205–214. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90072-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90072-X).
- Downing, G., 2002. Impact of spectral composition on larval haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L., growth and survival. *Aquac. Res.* 33 (4), 251–259. <https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2002.00668.x>.
- Eding, E., Kamstra, A., 2001, January. Design and performance of recirculation systems for European eel and African catfish. *Proc. AES Workshop* 18–28 (Orlando, FL).
- Fatollahi, M., Kasumyan, A.O., 2006. The sensory bases of the feeding behaviour of the African catfish (Clariidae, Siluriformes). *J. Ichthyol.* 46, 161–172. <https://doi.org/10.1134/S0032945206110051>.
- Fisheries and Aquaculture Department, 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. FAO, Rome, Italy. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.
- Hildebrand, M.C., Rebl, A., Nguinkal, J.A., Palm, H.W., Baßmann, B., 2023. Effects of Fe-DTPA on health and welfare of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Water* 15 (2), 299. <https://doi.org/10.3390/w15020299>.
- Homoki, D., Odunayo, T., Minya, D., Kovács, L., Lelesz, J., Bársony, P., Fehér, M., Kövics, G., Stündl, L., 2021. The effect of dissolved oxygen on common carp (*Cyprinus carpio*) and basil (*Ocimum basilicum*) in the aquaponics system. *Acta Agrar. Debr.* (1), 89–96. <https://doi.org/10.34101/ACTAAGRAR/1/8933>.
- Isaac, A.O., Joshua, O.S., Jehu, A., 2017. Behavioural and some physiological assessment of glyphosate and paraquat toxicity to juveniles of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Pak. J. Zool.* 49 (1), 183–190. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.1.183.190>.
- Kaiser, H., Weyl, O., Hecht, T., 1995. The effect of stocking density on growth, survival and agonistic behaviour of African catfish. *Aquac. Int.* 3, 217–225. <https://doi.org/10.1007/BF00118103>.
- Kawamura, G., Bagarinao, T.U., Seng, L.L., 2015. Fish behaviour and aquaculture. *Aquac. Ecosyst.: Adapt. Sustain.* 70–106. <https://doi.org/10.1002/9781118778531.ch3>.
- Knaus, U., Palm, H.W., 2017. Effects of the fish species choice on vegetables in aquaponics under spring-summer conditions in northern Germany (Mecklenburg Western Pomerania). *Aquaculture* 473, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.020>.
- Knaus, U., Wenzel, L.C., Appelbaum, S., Palm, H.W., 2020. Aquaponics (sl) Production of spearmint (*Mentha spicata*) with African catfish (*Clarias gariepinus*) in Northern Germany. *Sustainability* 12 (20), 8717. <https://doi.org/10.3390/su12208717>.
- Lee, C., Kawamura, G., Senoo, S., Ching, F., Luin, M., et al., 2014. Colour vision in juvenile African catfish *Clarias gariepinus*. *Int. Res. J. Biol. Sci.* 3 (1), 36–41.
- Mukai, Y., Sanudin, N., Firdaus, R.F., Saad, S., 2013. Reduced cannibalistic behavior of African catfish, *Clarias gariepinus*, larvae under dark and dim conditions. *Zool. Sci.* 30 (6), 421–424. <https://doi.org/10.2108/zsj.30.421>.
- Ndubuisi, U.C., Chimezie, A.J., Chinedu, U.C., Chikwem, I.C., Alexander, U., 2015. Effect of pH on the growth performance and survival rate of *Clarias gariepinus* fry. *Int. J. Res. Biosci.* 4 (3), 14–20.
- Ojelade, O.C., Durosaro, S.O., Akinde, A.O., Abdurraheem, I., Oladebo, M.B., Sopein, C., Bhadmus, A.S., Olateju, M., 2022. Environmental enrichment improves the growth rate, behavioral and physiological response of juveniles of *Clarias gariepinus* under laboratory conditions. *Front. Vet. Sci.* 9, 1566. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.980364>.
- Owen, M.A., Davies, S.J., Sloman, K.A., 2010. Light colour influences the behaviour and stress physiology of captive tench (*Tinca tinca*). *Rev. Fish. Biol. Fish.* 20, 375–380. <https://doi.org/10.1007/s11160-009-9150-1>.
- Palm, H.W., Knaus, U., Wasenitz, B., Bischoff, A.A., Strauch, S.M., 2018. Proportional up scaling of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) commercial recirculating aquaculture systems disproportionately affects nutrient dynamics. *Aquaculture* 491, 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.021>.
- Păpuș, T., Petrescu-Mag, I.V., Gavriloiu, C., Botha, M., Kovacs, E., Coroian, C.O., 2019. Swimming in the mud – a short review of environmental parameter ranges tolerated by *Clarias gariepinus*. *ELBA Bioflux* 11 (1), 9–17.
- Pasch, J., Palm, H.W., 2021. Economic analysis and improvement opportunities of African catfish (*Clarias gariepinus*) aquaculture in northern Germany. *Sustainability* 13 (24), 13569. <https://doi.org/10.3390/su132413569>.
- Pohlmann, K., Grasso, F.W., Breithaupt, T., 2001. Tracking wakes: the nocturnal predatory strategy of piscivorous catfish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (13), 7371–7374. <https://doi.org/10.1073/pnas.12102629>.
- Prokešová, M., Stejskal, V., Matoušek, J., Kouril, J., Baras, E., 2017. Effect of light intensity on early ontogeny of African sharp-tooth catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquac. Res.* 48 (1), 347–355. <https://doi.org/10.1111/are.13116>.
- Radenko, V., 1991. Importance of temperature and light to growth and survival of larval silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*. *Vopr. Ikhtiol.* 31, 655–663.
- Romanova, E.M., Romanov, V.V., Lyubomirova, V.N., Shadieva, L.A., Shlenkina, T.M., 2020. Increase in nonspecific resistance of catfish (*Clarias gariepinus*) in industrial aquaculture (EDP Sciences). *BIO Web Conf.* 17, 00122. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20201700122>.
- Ruchin, A., 2004. Influence of colored light on growth rate of juveniles of fish. *Fish. Physiol. Biochem.* 30 (2), 175–178. <https://doi.org/10.1007/s10695-005-1263-4>.
- Saleh, H.H., 2020. Effect of feeding on fresh (wet) housefly maggots (*Musca domestica*) with or without artificial diet on water quality and growth rates of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) fry under laboratory conditions. *J. Zool. Res.* 2 (2). <https://doi.org/10.30564/jzr.v2i2.2053>.
- Sallehudin, F., Mukai, Y., 2014. Cannibalistic behaviour of African catfish juveniles, *Clarias gariepinus* under different light wavelengths and intensities. 3rd International Conference on Applied Life Sciences (ICALS2014). ISALS Publishing, Malaysia, pp. 51–55.
- Sallehudin, M.F., Yusoff, N.A., Tan, N.H., Saad, S., Mukai, Y., 2017. Optimum light wavelength and light intensity for rearing juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). *Int. J. Aquat. Sci.* 8 (2), 107–112.
- Sierra-Flores, R., Davie, A., Grant, B., Carboni, S., Attack, T., Migaud, H., 2016. Effects of light spectrum and tank background colour on atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae performances. *Aquaculture* 450, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.041>.
- Solomon, S.G., Okomoda, V.T., 2012. Growth response and aggressive behaviour of *Clarias gariepinus* fingerlings reared at different photoperiods in a water recirculatory system. *Livest. Res. Rural Dev.* 24 (11), 1–5.
- Suhl, J., Dannehl, D., Baganz, D., Schmidt, U., Kloas, W., 2018. An innovative suction filter device reduces nitrogen loss in double recirculating aquaponic systems. *Aquac. Eng.* 82, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.008>.
- Tucker, J.W., 1998. The Rearing Environment. In: *Marine Fish Culture*. Springer, Boston, MA, pp. 61–66. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4911-6_3.
- Ullmann, J.F., Gallagher, T., Hart, N.S., Barnes, A.C., Smullen, R.P., Collin, S.P., Temple, S.E., 2011. Tank color increases growth, and alters color preference and spectral sensitivity, in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 322, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.005>.
- Van de Nieuwegeijnen, P.G., Boerlage, A.S., Verreth, J.A., Schrama, J.W., 2008. Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of

- juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. Appl. Anim. Behav. Sci. 115 (3-4), 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.05.008>.
- Van de Nieuwegiessen, P.G., Olwo, J., Khong, S., Verreth, J.A., Schrama, J.W., 2009. Effects of age and stocking density on the welfare of African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. Aquaculture 288 (1-2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.009>.
- Wenzel, L.C., Berchtold, E., Palm, H.W., 2022. Effects of stocking density and grading on behaviour, cannibalism and performance of African catfish (*Clarias gariepinus*) fry. Aquac. Rep. 27, 101400. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101400>.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Parisa Norouzitallab,
Swedish University of Agricultural Sciences,
Sweden

REVIEWED BY

Sevdan Yilmaz,
Çanakkale Onsekiz Mart University, Türkiye
Pronob Das,
Central Inland Fisheries Research Institute
(ICAR), India

*CORRESPONDENCE

Marc-Christopher Hildebrand
✉ marc-christopher.hildebrand@uni-
rostock.de

RECEIVED 07 February 2024

ACCEPTED 30 April 2024

PUBLISHED 30 May 2024

CITATION

Hildebrand M-C, Rebl A, Goldammer T,
Palm HW and Baßmann B (2024) Effects of
Zn-EDTA on the health and welfare of the
African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell,
1822), in a recirculating aquaculture system.
Front. Aquac. 3:1383534.
doi: 10.3389/faquc.2024.1383534

COPYRIGHT

© 2024 Hildebrand, Rebl, Goldammer, Palm
and Baßmann. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Effects of Zn-EDTA on the health and welfare of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), in a recirculating aquaculture system

Marc-Christopher Hildebrand^{1*}, Alexander Rebl²,
Tom Goldammer², Harry Wilhelm Palm¹ and Björn Baßmann¹

¹Department of Aquaculture and Sea-Ranching, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, University of Rostock, Rostock, Germany, ²Working Group Fish Genetics, Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany

As nutrient-rich water in aquaponic systems cannot supply growing plants with all the required trace elements, supplementation with specific fertilizers is performed to make up for this deficit. While chelated fertilizers such as ethylenediaminetetraacetic acid–zinc disodium complex (Zn-EDTA) are becoming more popular in this context for improving plant growth in aquaponic systems, little is known about their effects on fish. During two experiments, a total of 576 individuals of catfish fry (0.19 g) and fingerlings (220.01 g) of the African catfish (*Clarias gariepinus*; Burchell, 1822) were kept separately for 32 days under experimental aquarium conditions. The fry was exposed to 0.125 and 0.5 mg/L, while the fingerlings were exposed to 0.5 and 2.0 mg/L Zn-EDTA in a plantless aquaponic system. The third treatment group consisted of a control group without Zn-EDTA. The growth, mortality, and ethological indicators were assessed for all growth stages, while the leukocyte distribution and histopathological changes were additionally determined for the fingerlings. As the feed intake in the experiment was limited, the investigations were focused on the effects of Zn-EDTA and not on the growth process of a respective fish growth stage. While the growth, mortality, and behavior were not significantly different in both growing stages, the number of mature neutrophils changed significantly in all treatments in fingerlings. Zn was not detected in the histologically investigated organs at the tested concentrations using the staining method. However, morphological alterations of the gill epithelium were found on the secondary lamellae. Quantitative multiplex PCR was used to simultaneously evaluate the expression of 17 genes related to Zn metabolism and stress physiology in head kidney samples. The transcripts of several selected genes changed by up to 70-fold. Due to high individual variances, only the copy numbers of the *KMT2A* (lysine-specific methyltransferase 2a) gene were significantly different across treatment groups and sampling points. However, the present results indicate that the addition of Zn-EDTA at the tested concentrations can be considered relatively benign for the health and welfare of *C. gariepinus*, as no toxic effects of Zn-EDTA were observed in moderately hard to hard water.

KEYWORDS

aquaponics, fertilizer, fish histopathology, trace elements, toxicity

Highlights

- First study investigating the multiple effects of Zn-EDTA exposure on the African catfish, *Clarias gariepinus*, to aquaponic-related concentrations.
- Zn-EDTA exposure up to 2.0 mg/L showed small effects in the catfish liver.
- Zn-EDTA exposure up to 0.5 mg/L increased the occurrence of edema, fusions, and hyperplasia in catfish gills.
- Zn-EDTA exposure affects the gene expression of *KMT2A* and *MTF1* in catfish fingerlings.

1 Introduction

Presently, fish are increasingly exposed to various fertilizer components originating from fertilizer discharges from agriculture and chemical industry facilities or as emissions resulting from mining activities. In agriculture, the combined production of fish and plant, known as aquaponics, uses circulating nutrient-rich water and the addition of specific fertilizers to provide cultivated plants with all the essential nutrients, which, together, lead to better plant development and productivity of the system. Since the water used for this plant cultivation system usually originates from a closed aquaculture system and is therefore reused for plant growth, aquaponics is generally considered a highly sustainable method for crop production (Stathopoulou et al., 2021). However, as the single nutrient composition of the circulating water of an aquaculture system, as well as through supply by fish feed, is mostly insufficient (Sonneveld et al., 2009; Krishnasamy et al., 2012; Bittsanszky et al., 2016), the supplementation of fertilizers seems inevitable (Da Silva Cerozi, 2020; Stathopoulou et al., 2021). Similar to other plants, aquaponically grown plants have species-specific requirements of macro- and micronutrients. Since nitrogen (N) and phosphorus (P) are supplied by the fish in an aquaponic system, only the trace nutrients such as iron (Fe), copper (Cu), boron (B), molybdenum (Mo), manganese (Mn), zinc (Zn), and potassium (K) might be deficient to meet the plant's requirements (Strauch et al., 2018). To balance these deficits in an aquaponic system, nutrients can either be added to the water as compounds of salts such as sulfates (SO_4^{2-}), chlorides (Cl^-), or nitrates (NO_3^-); as part of chelated compounds such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethylenediamine-*N,N'*-bis(2-hydroxyphenylacetic acid) (EDDHA), or diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA); or as components of organic acids including fulvic acid or amino acids such as arginine, glycine, or histidine (Linnik and Ignatenko, 2015; Shuhaimi-Othman et al., 2015; Kasozi et al., 2019; Da Silva Cerozi, 2020; Neocleous et al., 2020; Yep and Zheng, 2020).

Not only for aquaponic plants, Zn is one of several elements necessary for development and growth by protein synthesis, carbohydrate metabolism, pollen formation, heat stress, protection from photo-oxidative damage, biological membrane

preservation, or infection resistance (Alloway, 2008). Similar to other plants, aquaponic plants can react to a Zn deficiency situation with many symptoms, including browning of the leaves due to a specific crossing structure, stagnation of the growth process, and the formation of infertile buds (Goddek et al., 2019; Yang and Kim, 2019). In order to avoid the aforementioned deficits, Zn, as a component of different chemical compounds, is already supplemented at concentrations up to 0.45 mg/L in hydroponic systems (Krishnasamy et al., 2012; Neocleous et al., 2020). At present, in aquaponic cultivation systems, the targeted supplementation of Zn is processed in combination with an EDTA chelator, which provides resistance against oxidation or dissolution and enables a constant pH-dependent availability of Zn in the water to a plant (Rakocy, 2012).

As an essential nutrient for both plants and fish, Zn plays a fundamental role in cell metabolism. In finfish, the uptake, efflux, and compartmentalization of Zn ensure homeostasis and prevent its toxic overaccumulation (Zheng et al., 2010). Its main vectors into a fish body are the uptake through the gills or *via* the gastrointestinal tract (Watanabe et al., 1997; Coetzee et al., 2002; Mahboub et al., 2020). Zn^{2+} transport *via* a chelate complex (i.e., EDTA) has also not been excluded for aquatic species (Hockett and Mount, 1996; Karayakar et al., 2021). As an essential element for life, Zn is also present in several amino acids and enzymes and plays a central role in protein folding (Ezeonyejiaku et al., 2010, 2012). In addition, recent studies have underlined its importance in enhancing the reproduction, antioxidant response, and growth performance of fish (Onuegbu et al., 2018; Kaliky et al., 2019).

As a variety of fish species can live in the reused water of an aquaponic system, an imbalance in the essential plant nutrients such as Zn, which are metabolically active to the fish, can negatively affect the growth, health, and welfare of specific fish species (Karayakar et al., 2021). Thus, controlled supplementation is important. In particular, the concentration thresholds of these micronutrients should be well known and not exceeded in cultivated species. An overdose of micronutrients, which is usually species-specific, can ultimately reduce the growth, damage the internal organs, induce different types of diseases, increase mortality, and even change the behavior of fish (Karayakar et al., 2021). Various negative reactions of fish to Zn have recently been reported, including the increased mortality of *Clarias gariepinus* in LD_{50} toxicity studies to zinc sulfate (ZnSO_4) at 71.0 and 75.3 mg/L supplementation (Ezeonyejiaku et al., 2010; Chidiebere, 2019); the inhibited growth of *Oncorhynchus mykiss* and *Oreochromis niloticus* (Eisler, 1993; Abdel-Tawwab et al., 2012); hypocalcemia in *O. mykiss* (Niyogi and Wood, 2006); the increased glucose, cortisol, and creatinine as a stress response in *O. niloticus* (Firat and Kargin, 2010; Abdel-Tawwab, 2016); behavioral alterations in *C. gariepinus* and *O. niloticus* (Ololade and Ogini, 2009; Duran and Erdem, 2014; Tunçsoy and Erdem, 2014; Chidiebere, 2019); changes in the physiological and biochemical properties of the blood or immune cells in *Ictalurus punctatus* and *C. gariepinus* (Lewis and Lewis, 1971; Gatlin et al., 1989; Coetzee et al., 2002; Ololade and Ogini, 2009); and the pathological alterations in the organs of *Pimephales promelas*, *Pseudupeneus prayensis*, and *C. gariepinus* (Brungs, 1969; Heath, 1995; Roméo et al., 1999; Coetzee et al., 2002; Shuhaimi-

Othman et al., 2015), such as hemorrhage in the gills or fins and extensive body and gill mucus in *Labeo rohita* and *O. mykiss* (Bengari and Patil, 1986; Hogstrand et al., 2002; Wood, 2017). Furthermore, several accumulation ratios of Zn and Zn-EDTA in the gill and liver tissues of *Cyprinus carpio* had been described by Karayakar et al. (2021), which will be discussed in this context.

Over the last few years, tolerance tests for the compatibility of nitrate-phosphorus-potassium (NPK) fertilizers, trace potassium nutrients, and Fe-DTPA have been carried out for the African catfish (*C. gariepinus*; Burchell, 1822), confirming their beneficial potential in aquaponics (Ajima et al., 2015; Shuhaimi-Othman et al., 2015; Wenzel et al., 2021; Hildebrand et al., 2023). Aligning with this approach, the present study aimed to quantify the effects of Zn-EDTA on the health and welfare of African catfish fry and fingerlings in two separate experiments using concentrations relevant for aquaculture and aquaponics (approximately 0.5 mg/L). Therefore, the fry and juveniles of African catfish were treated with various concentrations of Zn-EDTA in two separate experiments, focusing on the growth performance, ethological indicators, blood and histopathological analyses, and genetic profiling of critical genes to assess the potential hazards of Zn fertilization to the selected fish species (Seibel et al., 2021). From this assessment, we expected Zn-EDTA to have no adverse effects on the health and welfare of this species at water concentrations equivalent to those recommended for plant growth in aquaponic systems (0.45 mg/L).

2 Material and methods

2.1 Experimental design and system maintenance

In order to investigate the responses to the target concentration of 0.5 mg/L Zn-EDTA of two different growth stages of the African catfish, two separate experiments using concentrations close to 0.5 mg/L were carried out for 32 days each at the aquaculture research facility “Fischglashaus” of the University of Rostock, Germany. In the first experiment (Exp. A), African catfish fry were exposed to concentrations lower than 0.5 mg/L Zn-EDTA (control, 0.125, and 0.5). In the second experiment (Exp. B), African catfish fingerlings were exposed to concentrations higher than 0.5 mg Zn-EDTA (control, 0.5, and 2.0) as they are supposedly less sensitive to nutrient solutions. We applied the definition of the three Zn-EDTA treatments (0.125, 0.5, and 2.0 mg/L) based on the calculated effect size in each experimental design. This included an additional safety threshold of 10% to the required minimum hydroponic concentration of 0.45 mg/L.

To create a respective Zn milieu, we used Zn-EDTA containing 14.5% Zn²⁺, supplied by Phygenera Germany (EC no. 237–865-0), and labeled the respective treatments in Exp. A as A-ZnEDTA-0.125 and A-ZnEDTA-0.5, while those in Exp. B were accordingly labeled as B-ZnEDTA-0.5 and B-ZnEDTA-2.0. The control treatments in both experiments were labeled ZnEDTA-0 and had a total background Zn concentration of 0.051 mg/L. To maintain stable concentrations of Zn-EDTA, we followed the dilution

method and dosing protocol of Hildebrand et al. (2023) for our fertilizer and water management. In each experiment, the fish were stocked as triplicates in three separate recirculation systems, with three tanks ($L \times W \times H$: 100 cm $\times$ 50 cm $\times$ 32 cm for Exp. A and 100 cm $\times$ 50 cm $\times$ 35 cm for Exp. B) and one filter unit each (approximately 450 L). This resulted in a total system capacity of 950 L in Exp. A and 1,000 L in Exp. B. The rearing volume per tank in the catfish fry experiment was reduced to approximately 50 L habitat by placing perpendicularly oriented filter mats. In the fingerling experiment, no restrictions were imposed on the tank volume (120 L).

Common water quality parameters including temperature, dissolved oxygen (DO), electrical conductivity (EC), redox potential, and pH were determined daily using a portable multimeter (HQ40D; Hach Lange, Berlin, Germany). Samples were taken from the sumps in 3-day intervals to analyze nitrate (NO₃⁻), nitrite (NO₂⁻), ammonium (NH₄⁺), and *ortho*-phosphate (PO₄²⁻) using an Autoanalyzer (GalleryTM, Automated Photometric Analyzer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The total Zn concentrations were determined using Hach-Lange cell tests (LCK360 and LCS360), with the acid digestion (LCW902) conducted *via* a separate photometer (DR3900 RFID Spectrophotometer; Hach Lange). When the Zn concentrations deviated from the target concentrations, an additional Zn-EDTA solution was added.

2.2 Fish stocking and feeding

For each experiment, a total of 288 immature male and female African catfish (mixed sex) were received from a local fish hatchery (PAL Aquaculture GmbH, Kiel, Germany). The fry group (Exp. A) had a mean weight of 0.19 ± 0.02 g and a mean length of 2.8 ± 0.2 cm. Fish were stocked with 14 individuals per tank (3.6 fish/L). The fingerling group (Exp. B) had a mean weight of 220.01 ± 25.09 g and a mean length of 30.0 ± 1.7 cm. They were identified by sex through their abdomen and then stocked equally with 17 fish per tank (7.0 fish/L). Untreated water was used for 9 days to acclimatize the fish before exposure to the different concentrations of Zn-EDTA.

Reared fish were fed a commercial pelleted catfish diet (Exp. A: Coppens Start Premium, 0.3–1.5 mm; Exp. B: Coppens Special Premium, 5.0 mm) containing protein (45% A and 43% B), fat (15% A and 14% B), crude fiber (0.3% A and 1.6% B), ash (11.4% A and 6.7% B), total phosphorus (1.77% A and 1.01% B), and vitamin A (12,000 IU/kg A and 10,000 IU/kg B). In order to determine the performance of the fish in the current study, performance indicators (FCR, SGR, CF) were calculated by following Equations 1–3 respectively. To avoid high nutrient accumulation, the calculated feed amounts for fish fry were set to 3% and for fingerlings to 0.7% of their respective mean body weight. The corresponding daily feeding quantity was distributed by the number of feedings per day, as the catfish fry were fed four times (at 000, 600, 1200, and 1800 hours) and the fingerlings fed only once (at 1200 h). Over the 32-day experimental period, 14.0 g per tank was fed in Exp. A, while 52.3 g was fed in Exp. B.

The feed conversion ratio (FCR) was calculated as:

$$\frac{\text{TFI}}{(W_1 - W_0)} = \text{FCR} \quad (1)$$

where TFI is the total feed intake (in grams), W_0 is the initial fish weight (in grams), and W_1 is the final fish weight (in grams).

The specific growth rate (SGR) was calculated as:

$$\frac{(\ln(W_1) - \ln(W_0))}{T} * 100 = \text{SGR} \quad (2)$$

where W_0 is the initial fish weight (in grams), W_1 is the final fish weight (in grams), and T is the number of days.

2.3 General sampling procedures

The African catfish fry in Exp. A were captured in total and their weight and length measured on days 11, 12, 21, and 32 to monitor their weekly growth performance. Subsequently, the fish were placed back into their respective rearing tanks. In Exp. B, three fingerlings were taken from each group on days 11, 12, 21, and 32, stunned manually, and then killed. Afterward, the sex, length, and weight were determined. The fish collected on days 11, 12, 21, and 32 were further examined for their potential genetic reaction to Zn-EDTA (see Sections 2.5 and 2.6) and for changes in their blood on days 11, 21, and 32 (see Section 2.4). Blood samples of approximately 5 mL were taken from the caudal vessels of the fish, transferred into a cooled EDTA tube (BD Vacutainer, K2E 5.4 mg), and further processed for smear analysis shortly thereafter.

By the end of the experiments, all individuals were counted, measured, and then killed.

Fulton's condition factor (CF) was estimated according to Ricker (1973).

$$\frac{100 \cdot W}{L^3} = \text{CF} \quad (3)$$

where CF is Fulton's condition factor, W is the weight (in grams), and L is the length (in centimeters).

All treatments were carried out in accordance with the EU guidelines for animal experiments and have been approved by the responsible ethics committee.

2.4 Blood smear analysis and skin lesion documentation

In Exp. B, blood samples from days 11, 21, and 32 were transferred into EDTA tubes (BD Vacutainer, K2E 5.4 mg) and cooled subsequently. Blood smear slides were then obtained from 50 μL of the cooled blood samples and stained according to Pappenheim (Mulisch, 2015). Subsequently, the samples were fixed in Canada balsam to assess the immune status by cell type distribution using a leukogram. Collectively, these preparations were analyzed under a light microscope (Olympus BX 53; cellSens Application Software, v. 1.5) at $\times 500$ magnification. In order to create a differential blood count of a specific treatment group, at

least 100 cells per blood carrier were counted and the leukocyte types determined. The counting procedure was repeated five times to increase the statistical accuracy according to Rümke and Klein (1987). Finally, the asexual mean values of the respective treatments were calculated, taking into account the cell counts of three samples from a particular group. Possible sex-related differences in the mean values of the cell populations were terminated using a standard counting procedure. Further cell type determination was conducted according to the methodology of Hildebrand et al. (2023).

For the fingerlings in Exp. B, the size and the quantity of skin lesions were registered for each sampled fish. For the determination of the lesion area, a transparent template with a 0.25-cm^2 grid was placed on each lesion so that the smallest possible lesion area could be noted. Lesion areas per fish were then summed in total. This procedure was not performed in Exp. A as the fish in this group were too small.

2.5 Organ retrieval and histological analysis

For the fry that were sampled in Exp. B, special attention was paid to the exposure of relevant organs for toxicity testing. Hepatic tissue was collected by cutting a 5-mm^3 fragment from the mid-liver area. A tissue sample (1 cm) was collected from the outer left astial arch of a gill. Both of the organs were preserved in 15% formalin/5% methanol and stored at 8°C . On days 11, 12, 21, and 32, the upper part of the head kidney was removed, stored at -80°C , and used for gene expression analyses. Histological specimens were prepared according to the protocol of Hildebrand et al. (2023) and subsequently stained with a Midorikawa solution (Midorikawa and Eder, 1962) to identify Zn^{2+} inclusions. The created histopathological samples were analyzed using a scanning microscope (Leica DM4 B; LAS X Application Software, v. 5.02). Images were evaluated and the severity grade of each organ sample was determined according to the classification of Johnson et al. (2009). The severity grades were defined as follows (Johnson et al., 2009):

- G0: unremarkable (no findings associated with a specific diagnostic criterion);
- G1: minimal (unremarkable to barely noticeable, fewer than two occurrences per microscopic field);
- G2: mild (conspicuous feature of tissue, three to five occurrences per microscopic field);
- G3: moderate (dominant feature of tissue, six to eight occurrences per microscopic field); and
- G4: severe (overwhelming feature of tissue, more than nine occurrences per microscopic field)

2.6 RNA isolation, primer design, and multiplex quantitative PCR

A panel of oligonucleotide primers of genes related to Zn homeostasis and general stress responses had been designed in a

previous study (Hildebrand et al., 2023). From this set (Table 1), 17 primer pairs were selected to profile the expression of *ATP6V1G1* (ATPase H⁺ transporting v1 subunit g1), *CASP3* (caspase 3), *CCNB1* (cyclin b1), *CS* (citrate synthase), *HMOX1A* (heme oxygenase 1), *HSP90AB1* (heat-shock protein 90 alpha family class b member 1), *HSPD1* (heat shock protein family d, member 1), *IL2* (interleukin-2), *KMT2A* (lysine-specific methyltransferase 2a), *MTF1* (metal regulatory transcription factor 1), *NKX2-3* (nk2 homeobox gene 3), *SLC30A5* (solute carrier family 30, member 5), *SLC39A8* (solute carrier family 39, member 8), *SP1* (sp1 transcription factor), *STK39* (serine/

threonine kinase 39), *UCP2* (uncoupling protein 2), and *ZEB1* (zinc finger e-box binding homeobox 1). In addition, four reference genes—*RNA18S* (RNA, 18S ribosomal), *RPL* (ribosomal protein pseudogene), *ACTB* (actin beta), and *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)—were included to serve as internal normalizers. The preparation of the RNA samples from the head kidneys of the treated and control fish ($n = 3$ per group) and the multiplex quantitative PCR analyses using the BioMark HD system (Standard BioTools, San Francisco, CA, USA) were carried out according to a previously published protocol (Hildebrand et al., 2023).

TABLE 1 Oligonucleotide-primer sequences derived from *Clarias gariepinus*, *Ictalurus punctatus* or *Pangasianodon hypophthalmus* from (Hildebrand et al., 2023).

Gene symbol	Gene product	Function	Sense primer (5'→3'), Antisense primer (5'→3')	Source (species; accession code)	Fragment length (bp)	PSQ score
Reference genes:						
<i>rna18s</i>	18S ribosomal RNA	Structure of eukaryotic ribosomes	CTCTGCTGGACGATGGCTTAC, TCGATGAAGAACGCAGCCAGC	<i>C. gariepinus</i> ; GQ465239	94	100
<i>actb</i>	Actin-beta	Cell structure and motility, intercellular signaling	ACCACCACAGCCGAGAGAGAA, CTTCAGCCATCTTTCCTTGGT	<i>C. gariepinus</i> ; EU527191	204	86
<i>gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Carbohydrate metabolism	TATGAAGCCCGCTGAGATCCC, GCCTCTTCTCACTGCAGGGT	<i>C. gariepinus</i> ; AF323693	106	99
<i>rpl</i>	Ribosomal protein, large subunit	Structure of eukaryotic ribosomes	ACTAAATAGCAACTGATCCCTATC, GAATATCTGACCACTAAGATCCG	<i>C. gariepinus</i> ; MW080924	134	96
Target genes:						
<i>atp6v1g1</i>	ATPase H ⁺ transporting v1 subunit g1	Intercellular Fe homeostasis	CGGAAAAACCGCGCTTGAAG, GACCAAGGAAGCCGCGGCAC	<i>P. hypophthalmus</i> ; XM_026922532	106	84
<i>c3a</i>	Complement component 3, variant a	Bacteria opsonization and destruction	ATGTCTTTTCGATGTCACGGTTTAT, TCGAACCAAGAGTAACGGCATG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017457024	114	93
<i>casp3</i>	Caspase 3	Apoptosis	CTCTTTATCATTCAGGCTTGTCG, GTACTCTACTGCTCCAGGTTATT	<i>I. punctatus</i> ; XM_017473312	139	95
<i>casp8</i>	Caspase 8	Apoptosis	GTTATCAGCCGAAGCCGCTCA, ATCCAGAGCTATGATGTGTCCG	<i>Cyprinus carpio</i> ; XM_042730675	157	91
<i>ccnb1</i>	Cyclin b1	Control of the G2/M transition phase of the cell cycle	TCAAAAATCGGAGAGGTTACAGC, TGCACTTTGCTCCCTCTCTGG	<i>I. punctatus</i> ; NC_030443	103	91
<i>cp</i>	Ceruloplasmin	Copper transportation, oxidation of iron (Fe ²⁺ to Fe ³⁺)	CCACAACGTTCTAGAAGAATCATA, CTAAGAATGGAGGTCCAACATAAAA	<i>I. punctatus</i> ; JF914943	155	87
<i>cs</i>	Citrate synthase	Aerobic metabolism	GGTGGTGAAGTGTCCGATGAAA, GCTATGGGCATGCTGTCTCTGA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017487510	94	94
<i>hmox1a</i>	Heme oxygenase 1	Cellular response to xenobiotic stimulus	GATTCTTCTGTGTCCCTGTATG, CCATCTACTTCCCTCAGGAGC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017491622	104	95

(Continued)

TABLE 1 Continued

Gene symbol	Gene product	Function	Sense primer (5'→3'), Antisense primer (5'→3')	Source (species; accession code)	Fragment length (bp)	PSQ score
Target genes:						
<i>hsf</i>	Heat-shock transcription factor 1	ERK signaling, stress response	GTGCAGTCCATCAACTTTGATTC, CTATTCAGGAGTTGCTGTCAGAA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017455240	111	93
<i>hsp90ab1</i>	Heat-shock protein 90 alpha family class b member 1	Chaperone function, stress response	GAACATCAAGCTGGGCATCCAT, TTACTACATCACTGGTGAGAGCA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017456214	167	87
<i>hspb1</i>	Heat-shock protein family b (small) member 1	Differentiation of cell types, stress response	ACAGGACAACTGGAAGGTGAAC, GATTATCGGAAACCATGAGGAGA	<i>Clarias batrachus</i> ; KT359728	107	97
<i>hspd1</i>	Heat shock protein family d (hsp60) member 1	Chaperone function, stress response	GCACGCTTGCTCTCAACAGGTT, AGACATGGCGATTGCTACTGGA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017469365	113	91
<i>igf1</i>	Insulin-like growth factor 1	Anabolism, growth	CGCCCAAAACACCAAAGAAACC, AGTGACGAGAAGAGGAGAGCG	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200295	164	100
<i>il2</i>	Interleukin-2	Activation and proliferation of lymphocytes	GTCGGCCTGGGAAAAAGCCAAT, TTATGTGTTGCACCAGACAACG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017474923	162	95
<i>il4</i>	Interleukin-4	Activation and proliferation of leucocytes	ATGAATCCTTGTGGAAGATTAGAG, GGAGTATTTGGTGAGAGAGGTAA	<i>P. hypophthalmus</i> ; XM_026924084	108	86
<i>il6</i>	Interleukin-6	Acute-phase response	GCAGTTGAAACGGGACTTCCCA, TGTACCAAGCTTACCTGCCTA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017455306	162	96
<i>kmt2a</i>	Lysine-specific methyltransferase 2a	Regulation of early development and hematopoiesis	ATTGGGTCGAAATCGTGCTGTAT, ATGATAAGCTTTCAGTGGCAGGT	<i>I. punctatus</i> ; XM_017490460	121	90
<i>mtf1</i>	Metal regulatory transcription factor 1	Catabolic regulation of cartilages	GTAGGAGGGCATTACAGGAAC, AGTCAGAACGCTGCCCCCTC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017475296	146	90
<i>nkx2-3</i>	NK2 homeobox 3	Cell differentiation	TACAGGACAACCTGGTGAAAG, ACAACTCTTGCTTTCCTGCTCTT	<i>I. punctatus</i> ; XM_017464595	119	89
<i>nr3c1</i>	Nuclear receptor subfamily 3 group c, member 1, glucocorticoid receptor	Stress response	TGTAGAAGGCCAACACAATATC, GAACCTAGAAGCACGCAAAAACA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017492397	137	94
<i>oser1</i>	Oxidative stress-responsive serine-rich protein 1	Oxidative stress	AACTGGCATGGATGCAGTCGAA, ACCTACTGTAGCTCTAAAATGCAA	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200453	120	93
<i>osgin2</i>	Oxidative stress growth inhibitor	Oxidative stress	AGGAGCCTGGCATGCAATGGA, GTGACCAATGACCGGGCCAC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017467887	129	91
<i>pgm3</i>	Phosphoglucosyltransferase 3	Carbohydrate metabolism	GACACAGGCAGGGCTGAATCT, CTTCGTACAGCACACTGTAACC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017494096	112	94
<i>sirt1</i>	Sirtuin 1	Oxidative stress	AGTGAGGTGCTAGGGTTAATGG, TTGGTCTTATCGCTTTATTACAGC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017461869	148	91

(Continued)

TABLE 1 Continued

Gene symbol	Gene product	Function	Sense primer (5'→3'), Antisense primer (5'→3')	Source (species; accession code)	Fragment length (bp)	PSQ score
Target genes:						
<i>slc30a5</i>	Solute carrier family 30, member 5	Zinc transportation	AATAGTCACCAAAAGACAGTGGAT, CATCGTTGTGCTCGAACACAG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017459891	134	90
<i>slc39a8</i>	Solute carrier family 39, member 8	Cellular zinc uptake, protection from inflammation-related injury and death	TTTAACCTGATCTCAGCCATGTC, TATGTTCCCTGAGATGAATGCCA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017489708	151	93
<i>slc46a1</i>	Solute carrier family 46, member 1	Folate transportation	AATGGCGACATGCACAAGGGTAT, AGAACAGCCTTGCCCCAGGG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017491375	129	88
<i>sp1</i>	SP1 transcription factor	Cell growth, apoptosis, differentiation and immune responses	AGCACAGCAGGTGATCAGGGA, GAGAAGCGTGACATGTCCATA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017450095	119	91
<i>st8sia4</i>	St8 alpha-n-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase	Synthesis of polysialic acid for cell adhesion molecule	GGTTCATGCAGTCAGAGGGTAC, CTTCTGCGATGAGATCCACTTG	<i>C. gariepinus</i> ; PRJNA820763	112	85
<i>stk39</i>	Serine/threonine kinase 39	Stress response	TGTAGTTGTTGCTGCTAACCTTC, AGATCCCTGACGAGGTGAAGC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017469076	116	89
<i>tlr5</i>	Toll-like receptor 5	Detection of bacteria	GGCAGCATGGGAAAGGGAGTT, GTTAAGGCTCTGGATCTGTCCA	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200229	103	96
<i>tnf</i>	Tumor necrosis factor alpha	Immune/acute-phase response	AAACCAGACGAGACCCAAGAAAT, TCTATGCAGTGGTTCGACAACG	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200172	130	96
<i>ucp2</i>	Uncoupling protein 2	Regulation of production of reactive oxygen species, function of mitochondria	GGCTCCAGATCCAAGGGGAGA, CCACGTAGTCTCTACAACGGG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017489367	131	92
<i>zeb1</i>	Zinc finger e-box binding homeobox 1	Repression of interleukin-2 function	GCAGAGACCAGCGGCATGTAA, ATACGAGTGCCCCAACTGTAAAA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017483097	156	89

2.7 Ethology analysis

Video-recorded ethological observations of all reared fish (including the swimming activity, escape attempts, agonistic behavior, air breathing, and stereotypy) were conducted in both experiments in order to assess possible effects of Zn-EDTA on the fish. Three independent recordings of a respective treatment were taken for 20 min on days 8, 18, and 28 following the recording protocol of Hildebrand et al. (2023). No fertilizer was used in the first recording session to provide each group with a reference for the following sessions. This allowed better identification of any variability due to the individual composition of the fish stock. An ethogram based on Van de Nieuwegiessen et al. (2008) was slightly modified following the scheme of Hildebrand et al. (2023) and was used to evaluate behavior. The total fish activity was calculated on the basis of all visible swimming and resting fish within a 5-min interval. All swimming and resting individuals were then counted and the numbers related to the total number of fish.

2.8 Statistics

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 27.0 (IBM Corp., 2020, Armonk, NY, USA). Mean values were initially analyzed using the Shapiro and Levene's tests in order to assess the normal distribution and homogeneity of variances of the data. For normally distributed data, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Kruskal–Wallis test was performed if the processed data were not normally distributed. If inhomogeneous variances were indicated by the Levene's test, a one-way Welch ANOVA was performed. In the case of significance ($p < 0.05$), the *post-hoc* tests Tukey's HSD (ANOVA), Dunnett T3 (Kruskal–Wallis), or Games–Howell (Welch's ANOVA) were conducted. Quantitative PCR (qPCR) data were analyzed using the RealTime PCR Analysis Software v. 4.5.2 (Standard BioTools, San Francisco, CA, USA). The results were then normalized against the geometric mean of three appropriate reference genes (i.e.,

RNA18S, *ACTB*, and *GAPDH*). The normalized copy numbers of the target genes were then analyzed using two-way ANOVA followed by Holm–Šidák’s *post-hoc* test.

3 Results

3.1 Water quality

The mean water physicochemical parameters are listed in [Table 2](#). The temperature of the water was stable in both experiments ($p > 0.05$). The measured oxygen saturation was slightly elevated in the control group of Exp. A and differed significantly from that of the ZnEDTA-0.5 group ($p < 0.05$), whereas the saturation values in Exp. B did not differ significantly between treatments. The EC values fluctuated in the water of both experiments and showed a maximum within the groups exposed to the highest Zn-EDTA concentrations (B-ZnEDTA-0.5 and B-ZnEDTA-2.0), which were significantly different from the control group (ZnEDTA-0). In addition, the measured redox potential decreased with increasing Zn-EDTA ($p > 0.05$). In both experiments, the pH values were nearly constant, i.e., approximately 8.6 in Exp. A and approximately 6.3 in Exp. B. The concentrations of *ortho*-phosphate and ammonium were found to be significantly different in Exp. A and Exp. B. A-ZnEDTA-0.125 showed a significantly lower concentration of *ortho*-phosphate compared with A-ZnEDTA-0.5 and the control, while B-ZnEDTA-0.5 showed a significantly higher concentration of ammonia compared with B-ZnEDTA-2.0 and the control. The CaCO_3 concentrations fluctuated slightly between 232.36 and 253.50 mg/L (from 13.03°dH or 2.32 mmol/L to 14.22°dH or 2.54 mmol/L), indicating moderate to hard water. As expected, there was a significant increase in total Zn with rising concentrations in the surrounding water.

3.2 Growth and mortality

The initial lengths and weights of the raised catfish were similar ($p > 0.05$) in all the treatment groups within the respective experiment. The final lengths, weights, and CF were also similar ($p > 0.05$). In the course of Exp. A, a few losses occurred ($p > 0.05$), but not as usual in a tank. In fact, the fish left their tanks by jumping and consequently died. In Exp. B, there was no mortality. The percent mortality and actual numbers are reported in [Table 3](#).

3.3 Fish behavior

In both experiments, no significant changes in the behavior of fish from the different treatment groups were observed upon the addition of Zn-EDTA. In Exp. A, significant differences were found in the air-breathing and agonistic behavior between days 8 and 28 in A-ZnEDTA-0.5 and A-ZnEDTA-0 ([Table 4](#)). Similarly, in Exp. B, the swimming activity and agonistic behavior showed significant differences between days 8 and 28. However, minor effects across all

treatment groups were observed in both experiments. For example, an increase in the air-breathing activity was observed in Exp. A and Exp. B over time. The number of skin lesions fluctuated largely during the experiment. Therefore, neither a correlation to the fertilizer addition nor to any other behavioral pattern could be determined.

3.4 Leukogram

The leukocyte cell type distribution of the fingerlings in Exp. B is shown as percentage in [Table 5](#). As a result, the class distribution of the known African catfish granulocyte types was calculated as a percentage of the total cell count. On day 11, there were no significant differences in the main cell types of leukocytes (e.g., lymphocytes and monocytes) and the types of emerging and mature neutrophils and eosinophils between treatments. Moreover, there was a significant difference in the presence of meta-granulocytes between B-ZnEDTA-0.5 and B-ZnEDTA-0 24 h after exposure. After 32 days of Zn-EDTA exposure, the cell distribution of mature neutrophils was significantly different between B-ZnEDTA-2.0 and B-ZnEDTA-0. Only a significantly lower number of meta-granulocytes were found between the respective control groups among the all-sampling days ($p < 0.05$). During the entire study (32 days), the cell distribution of mature neutrophils and the cell types of their precursors (neutrophil meta-/meso-granulocytes) changed significantly in all three treatment groups.

3.5 Histological assessment

In Exp. B, the results of the histopathological examination of the organ tissues of the fingerlings are presented in [Figures 1A–F](#). Cells of the primary and secondary gill filaments in each group showed no Zn inclusions. However, mild alterations (G2) such as hyperplasia, fusion of the secondary lamellae, alteration of mucous cells, and edema occurred in the gill filaments, especially in the B-ZnEDTA-0.5 and B-ZnEDTA-2.0 groups. However, this was not noticeable in the control group (G0).

3.6 Gene expression profiling

A panel of catfish-specific primers established in a previous study ([Hildebrand et al., 2023](#)) was used to profile the expression of 17 genes in the head kidney of African catfish on days 11, 12, 21, and 32 after Zn-EDTA exposure ([Table 1](#)). The transcript levels of a number of genes, including *SP1*, *MTF1*, *ZEB1*, *HSP90AB1*, and *STK39*, were similar across all treatment groups investigated. A few genes, e.g., *HSPD1*, *UCP2*, and *NKX2-3*, were generally at low levels and were not detectable in distinct treatment groups (indicated by the purple fields in [Figure 2A](#)). Although the levels of some transcripts were increased by more than 10-fold (i.e., *CASP3* in ZnEDTA-2.0 on days 21 and 32 and *IL2* in Zn-EDTA-0 and Zn-EDTA-0.5 on day 32), >20-fold (*IL2* in Zn-EDTA-0 on day 21), or even >70-fold (*NKX2-3* in Zn-EDTA-0 on day 21) compared with

TABLE 2 Mean water parameters ($\pm$ SD, $n = 22$) in Exp. A (fry) and Exp. B (fingerlings).

Parameter		Exp. A						Exp. B					
		ZnEDTA-0	$\pm$ SD	ZnEDTA-0.125	$\pm$ SD	ZnEDTA-0.5	$\pm$ SD	ZnEDTA-0	$\pm$ SD	ZnEDTA-0.5	$\pm$ SD	ZnEDTA-2.0	$\pm$ SD
Temperature	(°C)	28.31	1.16	28.14	1.27	28.43	0.97	26.94	0.60	26.96	0.54	27.08	0.43
DO	(mg/L)	8.45 a	0.20	8.24	0.17	8.21 b	0.13	7.04	0.70	6.84	0.86	6.56	1.07
EC	(μ S/cm)	521.16	32.28	515.72	33.87	523.25	44.35	607.47 a	45.15	626.03 a	44.50	648.09 b	52.49
Redox	(mV)	70.93	13.82	70.48	12.38	69.80	11.88	148.33	28.06	148.56	25.98	146.94	27.65
pH		8.65	0.06	8.63	0.08	8.61	0.07	6.32	0.73	6.20	0.84	6.36	0.76
NO ₃ ⁻	(mg/L)	16.43	3.51	15.63	2.98	18.19	4.05	212.94	65.98	244.96	70.71	222.99	65.78
NO ₂ ⁻	(mg/L)	B.m.r.	B.m.r.	B.m.r.	B.m.r.	B.m.r.	B.m.r.	0.09	0.11	0.08	0.12	0.07	0.09
PO ₄ ²⁻	(mg/L)	0.80 a	0.57	0.45 b	0.12	0.85 a	0.53	11.14	4.26	13.23	4.84	11.63	4.06
NH ₄ ⁺	(mg/L)	0.62	0.03	0.61	0.06	0.62	0.03	0.23 a	0.11	1.83 b	1.73	0.39	0.35
Hardness CaCO ₃	(mg/L)	232.36	31.61	239.31	22.53	235.17	23.92	246.40	24.24	265.45	26.27	253.50	20.49
Zn ²⁺ (LCS360 A/LCK360 B)	(mg/L)	0.051 a	0.032	0.113 a	0.092	0.467 b	0.220	0.06 a	0.05	0.51 b	0.22	1.73 c	0.74

In each experiment, means in a row followed by lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$) according to the Kruskal–Wallis test and Dunnett T3 post-hoc test.
DO, dissolved oxygen; EC, electrical conductivity; B.m.r., below measurement range.

TABLE 3 Mean growth ($\pm$ standard deviation (SD)) and mortality of *Clarias gariepinus* exposed to different Zn-EDTA concentrations.

	Exp. A			Exp. B		
	ZnEDTA-0	ZnEDTA-0.125	ZnEDTA-0.5	ZnEDTA-0	ZnEDTA-0.5	ZnEDTA-2.0
Initial weight (g)	0.196 $\pm$ 0.02	0.200 $\pm$ 0.03	0.194 $\pm$ 0.02	220.20 $\pm$ 27.87	221.10 $\pm$ 23.85	218.70 $\pm$ 23.76
Final weight (g)	2.506 $\pm$ 1.14	2.393 $\pm$ 1.56	2.080 $\pm$ 1.25	267.63 $\pm$ 34.42	262.34 $\pm$ 41.61	269.11 $\pm$ 42.24
Initial length (cm)	2.8 $\pm$ 0.13	3.0 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.2	29.90 $\pm$ 1.61	30.00 $\pm$ 1.72	30.10 $\pm$ 1.65
Final length (cm)	6.3 $\pm$ 1.7	5.9 $\pm$ 2.5	5.7 $\pm$ 2.4	33.38 $\pm$ 1.62	33.50 $\pm$ 2.17	32.04 $\pm$ 7.89
Total feed input (g)	62.34	66.91	60.26	156.0	156.0	160.0
FCR	1.25 $\pm$ 0.06	1.27 $\pm$ 0.01	1.31 $\pm$ 0.01	5.49 $\pm$ 6.46	12.04 $\pm$ 16.18	2.79 $\pm$ 2.82
SGR (%)	5.78 $\pm$ 0.07	6.25 $\pm$ 0.16	5.98 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.23	0.24 $\pm$ 0.26	0.43 $\pm$ 0.27
Condition factor	0.90 $\pm$ 0.06	0.91 $\pm$ 0.17	0.96 $\pm$ 0.12	0.76 $\pm$ 0.05	0.75 $\pm$ 0.05	0.79 $\pm$ 0.05
Mortality in % (n)	0 (0)	0 (0)	7 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

TABLE 4 Mean behavioral responses ($\pm$ SD, $n = 3$) of *Clarias gariepinus* fry (Exp. A) and fingerlings (Exp. B) exposed to different levels of Zn-EDTA.

Video and direct observations	Exp. A			Exp. B		
	ZnEDTA-0	ZnEDTA-0.125	ZnEDTA-0.5	ZnEDTA-0	ZnEDTA-0.5	ZnEDTA-2.0
Swimming activity (Total frequency) day 8	22.33 $\pm$ 9.02	29.33 $\pm$ 2.52	35.57 $\pm$ 1.53	31.33 $\pm$ 1.53 A	27.00 $\pm$ 4.36 a A	37.33 $\pm$ 4.62 b A
Swimming activity (Total frequency) day 18	24.67 $\pm$ 7.77	37.00 $\pm$ 1.0	32.67 $\pm$ 9.07	18.0 $\pm$ 1.0 B	18.33 $\pm$ 0.58	18.33 $\pm$ 0.58
Swimming activity (Total frequency) day 28	35.33 $\pm$ 2.08	34.0 $\pm$ 8.19	34.33 $\pm$ 4.04	11.0 $\pm$ 1.0 C	7.67 $\pm$ 3.51 B	7.33 $\pm$ 4.73 B
Escape attempts (Total frequency) day 8	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Escape attempts (Total frequency) day 18	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Escape attempts (Total frequency) day 28	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Air breathing Index (Total frequency) day 8	0.76 $\pm$ 0.48 A	1.00 $\pm$ 0.54	0.90 $\pm$ 0.70 A	2.12 $\pm$ 0.26	3.78 $\pm$ 1.68	3.57 $\pm$ 0.94
Air breathing Index (Total frequency) day 18	1.45 $\pm$ 0.18	3.36 $\pm$ 0.87	3.80 $\pm$ 1.34	5.20 $\pm$ 2.68	5.96 $\pm$ 0.69	4.54 $\pm$ 0.40
Air breathing Index (Total frequency) day 28	5.29 $\pm$ 2.54 B	4.18 $\pm$ 1.09	4.79 $\pm$ 0.71 B	6.67 $\pm$ 2.21	4.07 $\pm$ 2.66	5.67 $\pm$ 1.86
Agonistic behavior Index (Total frequency) day 8	0.33 $\pm$ 0.18 A	0.21 $\pm$ 0.07	0.19 $\pm$ 0.34	0.08 $\pm$ 0.07 A	0.23 $\pm$ 0.18	0.04 $\pm$ 0.03
Agonistic behavior Index (Total frequency) day 18	0.21 $\pm$ 0.07	0.17 $\pm$ 0.15	0.05 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.18	0.17 $\pm$ 0.19	0.33 $\pm$ 0.26
Agonistic behavior Index (Total frequency) day 28	0.05 $\pm$ 0.04 B	0.08 $\pm$ 0.13	0.00 $\pm$ 0.00	0.58 $\pm$ 0.18 B	0.40 $\pm$ 0.53	0.47 $\pm$ 0.31
Stereotypical behavior (Total frequency) day 8	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Stereotypical behavior (Total frequency) day 18	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Stereotypical behavior (Total frequency) day 28	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Skin lesions (n) day 11	n.g.	n.g.	n.g.	16	24	15
Skin lesions (n) day 21	n.g.	n.g.	n.g.	11	12	5
Skin lesions (n) day 32	n.g.	n.g.	n.g.	17	11	13
Skin lesion area (cm ²) day 11	n.g.	n.g.	n.g.	0.78 $\pm$ 0.84	1.42 $\pm$ 1.17	0.81 $\pm$ 1.22
Skin lesion area (cm ²) day 21	n.g.	n.g.	n.g.	0.69 $\pm$ 1.01	0.78 $\pm$ 1.03	0.39 $\pm$ 0.73
Skin lesion area (cm ²) day 32	n.g.	n.g.	n.g.	1.33 $\pm$ 1.18	0.97 $\pm$ 1.19	0.94 $\pm$ 1.63

TABLE 5 Differential blood count in Exp. B. The distribution of leucocyte types of *C. gariepinus* fingerlings during the exposure to different concentrations of Zn-EDTA (means $\pm$ standard deviation, $n=3$).

Cell type (%)	Day 11 (after 24 h)			Day 21			Day 32		
	ZnEDTA-0	ZnEDTA-0.5	ZnEDTA-2.0	ZnEDTA-0	ZnEDTA-0.5	ZnEDTA-2.0	ZnEDTA-0	ZnEDTA-0.5	ZnEDTA-2.0
Lymphocytes	65.45 $\pm$ 7.50	70.03 $\pm$ 3.34	68.72 $\pm$ 3.36	70.09 $\pm$ 8.93	67.75 $\pm$ 2.33	67.12 $\pm$ 7.07	69.14 $\pm$ 7.68	63.88 $\pm$ 2.15	67.62 $\pm$ 5.00
Monocytes	25.72 $\pm$ 5.25	21.94 $\pm$ 1.84	22.94 $\pm$ 0.30	25.78 $\pm$ 10.16	26.68 $\pm$ 3.18	22.96 $\pm$ 1.91	25.45 $\pm$ 8.39	28.78 $\pm$ 3.50	22.87 $\pm$ 4.02
Mature neutrophils	6.68 $\pm$ 2.48	6.41 $\pm$ 2.17	6.25 $\pm$ 2.16	2.87 $\pm$ 0.98	3.95 $\pm$ 0.64	6.74 $\pm$ 4.78	3.35 $\pm$ 0.53 a	4.78 $\pm$ 2.14	8.01 $\pm$ 0.66 b
Neutrophile meta-granulocyte	1.05 $\pm$ 0.18 a A	0.45 $\pm$ 0.78 b	0.72 $\pm$ 0.43	0.56 $\pm$ 0.19 B	0.44 $\pm$ 0.60	0.95 $\pm$ 0.70	1.37 $\pm$ 0.19 A	1.75 $\pm$ 1.40	0.56 $\pm$ 0.48
Neutrophile meso-granulocyte	0.84 $\pm$ 0.31	0.77 $\pm$ 1.02	0.59 $\pm$ 0.39	0.69 $\pm$ 0.40	0.94 $\pm$ 0.64	1.71 $\pm$ 1.24	0.50 $\pm$ 0.29	0.57 $\pm$ 0.50	0.75 $\pm$ 0.33
Eosinophils	0.26 $\pm$ 0.22	0.39 $\pm$ 0.39	0.78 $\pm$ 0.85	n.g.	0.25 $\pm$ 0.43	0.51 $\pm$ 0.48	0.19 $\pm$ 0.18	0.19 $\pm$ 0.32	0.25 $\pm$ 0.22

Distribution of the leukocyte types in *Clarias gariepinus* fingerlings during exposure to various concentrations of Zn-EDTA (mean $\pm$ SD, $n=3$). Means in a row followed by different letters are significantly different ($p<0.05$) according to ANOVA and Tukey's HSD post-hoc test. Lowercase letters indicate significance between treatment groups within a sampling event (a, b, c), while uppercase letters denote significance in particular groups over the entire study period (A, B, C). n.g., not given.

those of Zn-EDTA-0 on day 11 (Figure 2B), these differential expressions were not statistically significant. Only *KMT2A* revealed threefold significantly elevated transcript levels in the African catfish from the B-Zn-EDTA-2.0 group on day 21 ($p<0.01$) and the B-Zn-EDTA-0.5 group on day 32 ($p<0.05$) versus B-Zn-EDTA-0 on day 11 and B-Zn-EDTA-0.5 on day 12 (Figures 2A, B). Altogether, the qPCR data revealed poor responses of the 17 selected genes in *C. gariepinus* when exposed to Zn-EDTA.

4 Discussion

Trace elements such as Zn are necessary to fertilize aquaponic systems and to make up for the lack of supply for an improved and healthy plant growth. To achieve a better understanding of their effect on fish, we examined the responses of a common aquaponic-related living fish species (*C. gariepinus*) to Zn-EDTA fertilization in two single life stage experiments. In terms of its water quality requirements, *C. gariepinus* can tolerate various parameters of water quality, including temperatures between 18°C and 32°C, with optimal temperatures for development and growth ranging from 27°C to 29°C (Păpuc et al., 2019; Xu et al., 2022; Baßmann et al., 2023). While a pH value between 5.0 and 9.0 corresponds to the profile requirements of this species (Păpuc et al., 2019; Xu et al., 2022; Baßmann et al., 2023), in aquaponics, the pH value is generally lower (approximately 6.5–7.0) to allow a more efficient bacterial activity and nutrient uptake by plants (Tyson et al., 2004). The recommended DO values range from 3.0 to 6.0 mg/L (Păpuc et al., 2019); however, higher values up to approximately 9.0 mg/L are also considered suitable (Baßmann et al., 2020; Knaus et al., 2020; Baßmann et al., 2023). The reported EC tolerance ranges from 100 to around 2,000 μ S/cm (Hanika and Kramer, 2000; Tyson et al., 2004). According to Knaus and Palm (2017) and Homoki et al. (2020), an oxidative regime with a positive redox potential between

+83.4 and +151.7 mV is recommended for bacterial activity in aquaponic systems and is well tolerated by the African catfish. Concentrations of NO_3 , NO_2 , and $\text{NH}_4(\text{NH}_3)$ ranging up to 697.5, 0.6, and 20.46 mg/L, respectively (>0.34 mg/L) and of CO_3 from >10 to <500 mg/L have been shown to still be tolerable (Molokwu and Okpokwasili, 2002; Schram et al., 2010, 2014; Roques et al., 2015; Baßmann et al., 2017; Knaus et al., 2020). In this study, the measured water temperatures ranged between 26°C and 28°C, the pH values were between 6.0 and 8.0, and the DO values varied from 6 to 8 mg/L. The EC values were measured between approximately 515 and 648 μ S/cm, while the redox potentials ranged from +69 to +148 mV. Subsequently, all relevant parameters fitted the optimal or at least the adequate range for African catfish. Across both experiments, as the concentration of the fertilizer increased, the redox potential decreased, but remained in a positive (oxidative) state. Since the decrease in the redox potential in Exp. B was not linear, it can be assumed that the deactivation of the redox-active metal ions (Zn^{2+}) through the use of an EDTA chelator had a buffering effect on the redox potential (Reddy and Patrick, 1977; Tuncay et al., 2011). The Zn concentrations were measured continuously in short intervals through a monitoring system and were maintained at predefined levels between 0.125 and 0.5 mg/L in Exp. A and between 0.5 and 2.0 mg/L in Exp. B. Although, in some cases, the treatment groups exceeded the general Zn requirement of plants in an aquaponic system (0.45 mg/L), this was not found to have any serious effects on the fish. Further monitored water chemical parameters (i.e., O_2 , pH, NH_4 , NO_2 , NO_3 , and PO_4) remained unaffected by the different Zn-EDTA concentrations or appeared to be less influenced by the treatment. Although it is known that the toxic effect of heavy metals is influenced by the pH and the water hardness (Viljoen et al., 2003; Kiyani et al., 2013; Chidiebere, 2019), in the present study, values between 232 and 265 mg/L (CaCO_3) were detected, corresponding to medium-hard to hard water and contributing to a low toxic effect of the metal ions.

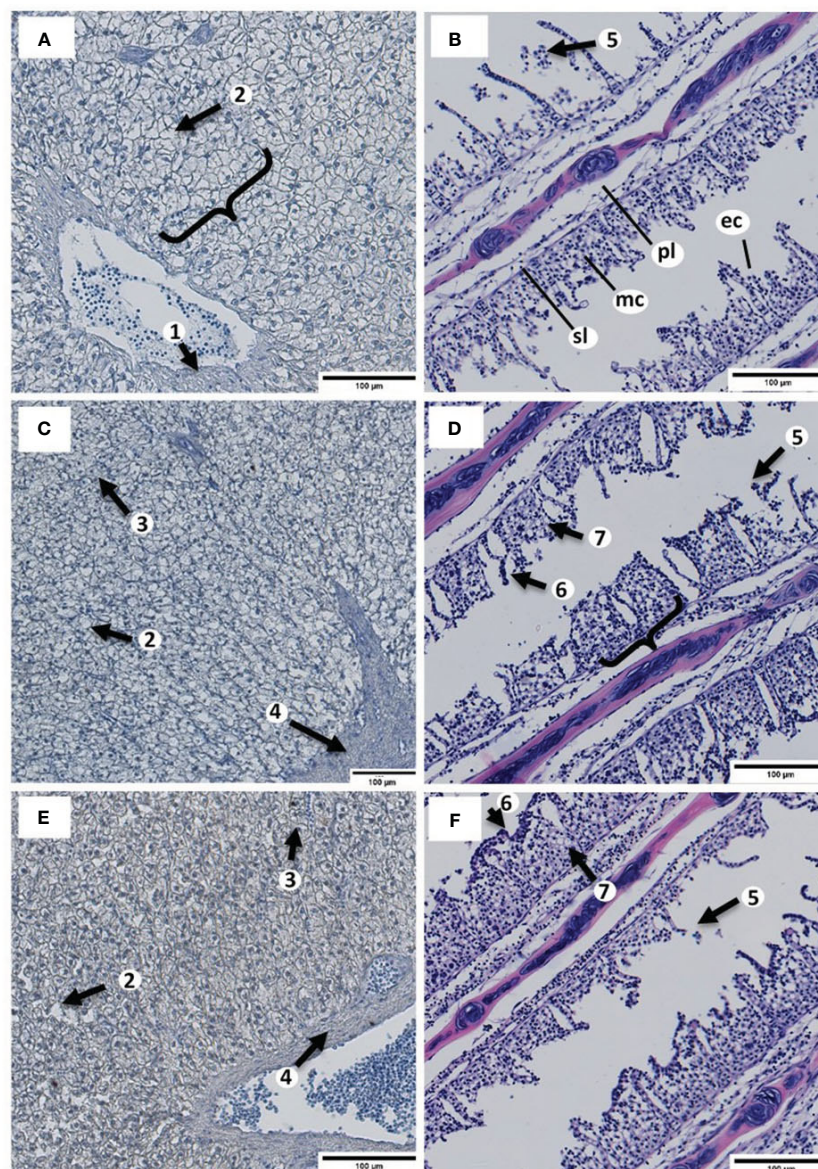
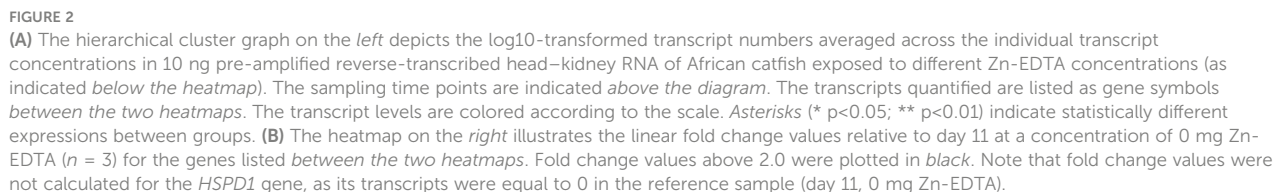


FIGURE 1

Histopathological evaluation of the liver and gill tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings exposed to different Zn-EDTA concentrations in Exp. B after 32 days to a scale of 100 μ m. The liver tissues (A, C, E) were stained to detect Zn (red/brown) according to Midorikawa and Eder (1962). The gill tissues (B, D, F) were stained using a common hematoxylin stain. (A) Liver cells of the B-ZnEDTA-0 control group with hepatic plate (clamp), vein with erythrocytes (arrow 1), white spotted lipid droplets (arrow 2), and without a noticeable coloration by Midorikawa Zn stain. (B) Gill filaments of the B-ZnEDTA-0 control group with primary lamellae (pl), secondary lamellae (sl), mucous cells (mc), and epithelial cells (ec) without remarkable inclusions or necroses. (C) Liver cells of the B-ZnEDTA-0.5 group with lipid droplets occurring next to hepatocytes (arrow 2), sinusoids congested with red blood cells (arrow 3), hepatic artery (arrow 4), and without coloration by Midorikawa stain. (D) Gill filaments of the B-ZnEDTA-0.5 group. Epithelial mucous detachments of the gills occurred in all groups (B, D, F) in Exp. B (arrow 5). Hyperplasia (arrow 6) and fusion of the secondary lamellae (clamp), in addition to an increased number of mucous cells and edema (arrow 7). (E) Liver cells of the B-ZnEDTA-2.0 group with light Midorikawa Zn stain coloration (light red brown hepatocytes) around the vascular arterial tissue (arrow 4), lipid droplets (arrow 2), and sinusoids (arrow 3). (F) Gill filaments of the B-ZnEDTA-2.0 group. Comparable findings to those of B-ZnEDTA-0.5 (D).

As the growth of two African catfish life stages was assessed as additional data in this study, it should be mentioned that both experiments were not aimed at achieving the most efficient growth performance possible for the respective fish. Both experiments were conducted in aquarium systems that allowed only a limited amount of feed (nutrients), ensuring the stability of the system. Consequently, the fish in all treatment groups showed only a few grams of growth. In addition, the mortality of the African catfish life

stages was determined in this study. For the African catfish fry (1.15–1.63 g), typical mortality ratios were described, ranging from 4.3% to 20.0% (Adewolu et al., 2008; Marimuthu et al., 2011); for fingerlings (102–288 g), these varied from 2.0% to 4.8% (Van de Nieuwegiessen et al., 2009; Knaus et al., 2020). As the tested lethal concentration of elemental Zn by 50% in 96 h (LC_{50}) to the African catfish has been calculated by Ezeonyejiaku et al. (2011) to the value of 70.135 mg/L and by Chidiebere (2019) to 75.36 mg/L, the



In this study, physiological changes from exposure to Zn-EDTA, such as the distribution of leucocytes in fish, were additionally assessed for *C. gariepinus* fingerlings. The typical distributed leukocytes of unsexed African catfish (weighing approximately 320 g) have been described as 55.0% lymphocytes, 3.2% monocytes, and 43.4% neutrophils (Gabriel et al., 2004). Furthermore, Bello et al. (2014) described lymphocytes at 69.0%, monocytes at 3.0%, neutrophils/heterophils at 25.0%, and eosinophils at 3.0%. This study found the monocyte cell counts to be generally higher in African catfish fingerlings, while the

frontiersin.org

all pathogens have been eliminated (day 32). A potential inflammatory response in the current study was probably the result of severe skin lesions due to increased agonistic interactions rather than a response to the Zn concentration in the water. A distinct effect of the added Zn-EDTA is therefore questionable. Regarding the lesions observed in the African catfish, the average number of skin lesions in individual fish has been reported between 1.4 and 2.4 (Tort, 2011; Baßmann et al., 2017). In the current study, the skin lesion counts ranged from 0.39 to 1.42, which correspond to a normal range and were not influenced by the Zn treatments.

In previous studies, a broad span of different behavioral patterns of teleost fish in response to Zn exposure had been observed. These behavioral patterns include hyperactivity swimming at the surface, lethargy, and uncoordinated movements (*C. gariepinus*: Chidiebere, 2019); acute lethality (*Scyliorhinus canicula*: Crespo and Blasch, 1980); and rapid and erratic swimming, stereotypical movements, and loss of balance and general weakness with delayed reactions to light and sound (*C. gariepinus*: Olojede and Ogini, 2009). In the current study, significance in the behavioral alterations was found for swimming activity and air breathing in Exp. A and Exp. B (Table 4). Previous studies have described the swimming activity of aquacultured African catfish to be 74.6%–99.0% (Van de Nieuwegiessen et al., 2008, 2009) and 71.9%–91.9% (Wenzel et al., 2022); therefore, the results of the current study are in the range between lower and normal activity. The swimming activity of the B-ZnEDTA-2.0 group on day 28 was significantly lower than that on day 8, but did not differ significantly from the control fish, which were more active. Therefore, a behavioral response to Zn-EDTA exposure cannot be excluded; however, the sample size was quite small, and other factors such as the group composition may have also played a role. Studies on the influence of Zn on the respiratory system of fish have shown that Zn disrupts the Ca^{2+} uptake in the gills of fish and causes hypoxemia, hypercapnia, acidosis, and hypocalcemia, depending on the carbonate concentration in the water (Skidmore, 1970; Spry and Wood, 1984; Sorensen, 1991), as cited in Crafford and Avenant-Oldewage (2011) and Chidiebere (2019). Van de Nieuwegiessen et al. (2008) observed air-breathing activities (i.e., event per fish per hour) between 12.0 and 104.0 with different fish stocking densities from 10 g to around 100 g, as well as activities between 80.0 and 83.0 with fish stocking densities from 102 to around 288 g (Van de Nieuwegiessen et al., 2009). In this study, a significant increase in air-breathing activity was found in the A-ZnEDTA-0.5 group between the start and the end of the experiment. As the effect also appeared in the control group in Exp. A and no similar effects were observed in Exp. B, a possible influence of the Zn concentration on this behavior pattern is questionable.

The dissected organs for histological microscopy analysis of *C. gariepinus* fingerlings revealed small alterations upon exposure to Zn-EDTA. Studies that examined the toxic effects of various concentrations of elemental Zn in different salts (ZnSO_4 or ZnCl_2) on *O. mykiss*, *Tilapia sparmanii*, or *C. gariepinus* revealed alterations in the epithelium (Lloyd, 1960; Skidmore, 1970; Hogstrand et al., 2002) and in the functionality of the gills (Burton et al., 1972; Mallatt, 1985; Van Rensbrug, 1989; Wood,

2017), as well as accumulations in different organs such as the gill, liver, muscle, and skin (Awoyemi et al., 2014; Duran et al., 2015). Later, using ICP-MS analysis, the combined effects and influence of Zn and Zn-EDTA (in concentrations from 4.0 to 8.0 mg/L) on *C. carpio* were investigated simultaneously by Karayakar et al. (2021) for more than 7 days of exposure. Their results revealed accumulations of Zn and Zn-EDTA in the tissues of the liver and gill at different uptake ratios. Moreover, they found a decreased ratio of Zn accumulation in tissue when the EDTA chelating agent was present in the treatment. In carp, the highest concentrations of Zn and Zn-EDTA were accordingly detected in the gills, as this organ is the most exposed to the environment of a fish (Chavan and Muley, 2014). Other studies investigated the toxic effects of Zn-EDTA on *Palaemon elegans* (Nugegoda and Rainbow, 1988). The authors described low Zn uptake in the presence of EDTA, as the chelator had a 1:1 molar binding ratio to Zn^{2+} and therefore reduced the amount of bioavailable Zn^{2+} ions (Nugegoda and Rainbow, 1988). Accordingly, a higher regulation ability of the Zn household was concluded. As metal components are taken up primarily by the fish liver, invading metal ions are therefore transformed into metallothionein proteins (Cherian and Nordberg, 1983; Shukla et al., 2007; Rose et al., 2014). These protein-metal complexes may be water-insoluble and become sequestered in lipid or fatty tissues, where they accumulate (Montaser et al., 2010; Awoyemi et al., 2014). The polar property of the chelator and its ligands, in order to shift through a membrane and become a metal-protein complex, appears to play a key role in the accumulation process. Hydrophilic metal complexes (Zn-EDTA) do not appear to be able to cross the hydrophobic cell membrane, as it is negatively charged and lipophobic (Nugegoda and Rainbow, 1988). Unlike lipophobic complexes, lipophilic complexes (such as Fe-DTPA) are able to cross these cell membranes and start to accumulate (Asik et al., 2020; Hildebrand et al., 2023). Our data documented low effects of the Zn-EDTA treatment in the liver and moderate effects in the gill tissues based on the staining and microscopy results. As only a light coloration was observed in the liver tissue at a concentration of 2.0 mg/L Zn-EDTA after 32 days of exposure, the accumulation process of Zn-EDTA in the liver tissue of the investigated species could not be verified at a quantitative level using the staining method. Therefore, further investigations on the liver and gill tissues of *C. gariepinus* are recommend using advanced methods such as atomic absorption spectrophotometry (AAS) or inductively coupled plasma (ICP) analysis in order to verify and assess the accumulation process in this context more precisely. However, the present results are consistent with the findings and expectations of Nugegoda and Rainbow (1988) and Karayakar et al. (2021), who assumed and found a lower accumulation potential of Zn alone and in combination with EDTA chelating agents. In addition, this study emphasized the low toxicity of Zn-EDTA to fish internal organs, which would be expected to be much higher when using elemental Zn chloride or sulfate compounds for exposure (Awoyemi et al., 2014; Duran et al., 2015; Karayakar et al., 2021). As the major effects on the investigated organs in this study were primarily observed in the gill tissues, the present results of the grading system used (G0–

G2, unremarkable to mild severity) were therefore based on the morphological alterations of the gill epithelium, which had been previously described by Lloyd (1960), Skidmore (1970), Zheng et al. (2011), and Srivatava and Prakash (2019), but did not have a significant effect on the respiratory system or the behavior.

Profiling of the genetic primers used for the African catfish, which have been established in a previous experiment (Hildebrand et al., 2023) through the catfish head kidney (Table 1), showed the significantly different expression of *KMT2A* dependent on the exposure time and the Zn-EDTA concentration. *KMT2A* encodes lysine methyltransferase 2A, which is involved in the early phase of hematopoiesis and in wound healing (Huang et al., 2015; Zhang et al., 2017; Davis et al., 2019), as well as in the development of granulocytes (Fujiki et al., 2011; Ichikawa et al., 2021). Based on the above-mentioned observations, we assumed that the increased granulocyte counts that occurred at later time points in our experiments correlate with the observed elevated *KMT2A* transcript levels. Furthermore, inconspicuous genes such as *MTF1* were similarly expressed through the treatments. As *MTF1* is involved in the production of metal-binding metallothionein (Wimmer et al., 2005; Günther et al., 2012), its homogeneous expression across the various Zn-EDTA concentration groups indicates matching Zn families in the examined individuals and a protective effect of Zn-EDTA on the fish organs.

In the aquaculture of African catfish, the process water can reach Zn concentrations between 0.334 and 0.413 mg/L (Strauch et al., 2018). These concentrations are close to those used in hydroponic plant production (0.45 mg/L) (Bittsanszky et al., 2016). In addition to the fact that the Zn in the process water is derived from compounds (such as ZnO, ZnCl, and ZnSO₄) in the fish diet, it is not clear whether the Zn compounds in the recirculating water could cause problems for the fish at higher concentrations (Duran et al., 2015) or are harmless to their health. Moreover, it is not known whether additional Zn-EDTA in the process water positively affects the Zn family in the fish or the dissociation equilibrium of the Zn compounds in the systems when the percentage feed intake is higher than that of industry standards. In the present study, the tested Zn-EDTA concentrations of up to 0.5 mg/L did not have any severe effects either to the fry or to the fingerlings at feed intakes between 0.7 and 3.0% bodyweight per day. Furthermore, the tested Zn-EDTA concentrations were most likely not intense enough to trigger the induction of the various relevant genes selected for the current study, although the possibility that the expression of several other genes not included as target genes in the present analysis may well respond to Zn-EDTA exposure could not be ruled out. Only the 2.0 mg/L concentration revealed negative effects, including the Zn accumulation in the liver tissue in the fingerling group, demonstrating a potential overdose. Consequently, the fertilizer ratio for younger fish should be adjusted according to the supplementation process in order to not exceed the maximum Zn concentration in the system. Since the tested concentration of 0.5 mg/L Zn-EDTA in our study did not harm the fish, we support the supplementation of Zn-EDTA to African catfish up to this concentration level. This also allows the supplementation in coupled aquaponics.

5 Conclusions

The growth and mortality of African catfish were not affected by Zn-EDTA at the tested concentrations up to 2.0 mg/L in *C. gariepinus* fry and fingerlings. The ethological analysis also showed no behavioral dependence on Zn-EDTA treatment. Since only minor histomorphological changes in the gill tissue occurred, especially in treatments with 0.5 and 2.0 mg/L Zn-EDTA, and the fertilization recommendation for Zn in hydroponics is 0.45 mg/L, we do not recommend an addition to aquaponics with African catfish above 0.5 mg/L. Furthermore, long-term studies should clarify whether there can also be a stronger influence on or damage to the animals in the case of a prolonged exposure. Our study revealed new opportunities for the careful use of fertilizers such as Zn-EDTA for a more effective, sustainable water management for entrepreneurs with aquaponic systems. Accordingly, we can now confirm, thus far, the relatively harmless potential of Zn-EDTA as a necessary trace element for plants and its toxic potential to the African catfish (*C. gariepinus*) to ensure better plant growth without harming the cultivated fish species at the intended concentration of 0.45 mg/L.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The animal study was approved by Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern - Veterinärdienste und Landwirtschaft. The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

Author contributions

M-CH: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. AR: Investigation, Methodology, Resources, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. TG: Investigation, Writing – original draft. HP: Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. BB: Conceptualization, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This study

was funded by the project “Performance and process water management in commercial (integrated) aquaculture systems with African catfish (*Clarias gariepinus*) in Mecklenburg-Western Pomerania” (MV-II.1-LM-007: 139030000103, EMFF: 7302).

Acknowledgments

We thank Markus Kipp and Frauke Winzer (Institute for Anatomy, University of Rostock) for histological sample preparation and assistance as well as Julian Krinitskij (FBN) for his assistance with the gene-expression profiling. We thank Leopold Hummel, Lisa Carolina Wenzel, Lu Xu, and Laura Ballesteros Redondo (Department of Aquaculture and Sea-Ranching, University of Rostock) for their assistance during the samplings.

References

- Abdel-Tawwab, M. (2016). Effect of feed availability on susceptibility of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) to environmental zinc toxicity: Growth performance, biochemical response, and zinc bioaccumulation. *Aquaculture* 464, 309–315. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.07.009
- Abdel-Tawwab, M., El-Sayed, G. O., and Shady, S. H. (2012). Effects of dietary protein levels and environmental zinc exposure on the growth, feed utilization, and biochemical variables of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Toxicological Environ. Chem.* 94, 1368–1382. doi: 10.1080/02772248.2012.703202
- Adewolu, M. A., Adeniji, C. A., and Adejobi, A. B. (2008). Feed utilization, growth and survival of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) fingerlings cultured under different photoperiods. *Aquaculture* 283, 64–67. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.07.020
- Ajima, M. N. O., Ogo, O. A., Akpa, L. E., and Ajaero, I. (2015). Biochemical and haematological responses in African catfish *Clarias gariepinus* following chronic exposure to NPK (15: 15: 15) fertiliser. *Afr. J. Aquat. Sci.* 40, 73–79. doi: 10.2989/16085914.2015.1020046
- Alloway, B. J. (2008). *Zinc in soils and crop nutrition* Vol. 139 (Brussels, Belgium and Paris, France: IZA and IFA), 9–10.
- Asik, D., Smolinski, R., Abozeid, S. M., Mitchell, T. B., Turowski, S. G., Spornyak, J. A., et al. (2020). Modulating the properties of Fe (III) macrocyclic MRI contrast agents by appending sulfonate or hydroxyl groups. *Molecules* 25, 2291. doi: 10.3390/molecules25102291
- Awoyemi, O. M., Bawa-Allah, K. A., and Otitolaju, A. A. (2014). Accumulation and anti-oxidant enzymes as biomarkers of heavy metal exposure in *Clarias gariepinus* and *Oreochromis niloticus*. *Appl. Ecol. Environ. Sci.* 2, 114–122. doi: 10.12691/aees-2-5-2
- Baßmann, B., Brenner, M., and Palm, H. W. (2017). Stress and welfare of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) in a coupled aquaponic system. *Water* 9, 504. doi: 10.3390/w9070504
- Baßmann, B., Hahn, L., Rebl, A., Wenzel, L. C., Hildebrand, M. C., Verleih, M., et al. (2023). Effects of stocking density, size, and external stress on growth and welfare of african catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) in a commercial RAS. *Fishes* 8, 74. doi: 10.3390/fishes8020074
- Baßmann, B., Harbach, H., Weißbach, S., and Palm, H. W. (2020). Effect of plant density in coupled aquaponics on the welfare status of African catfish, *Clarias gariepinus*. *J. World Aquaculture Soc.* 51, 183–199. doi: 10.1111/jwas.12574
- Bello, O. S., Olafia, F. E., and Emikpe, B. O. (2014). Haematological and blood biochemical changes in African catfish, *Clarias gariepinus* fed walnut (*Tetracarpidium conophorum* Mull Arg) leaf and onion (*Allium cepa* Linn) bulb supplemented diets. *Am. J. Exp. Agric.* 4, 1593–1603. doi: 10.9734/AJEA
- Bengari, K. V., and Patil, H. S. (1986). Respiration, liver glycogen and bioaccumulation in *Labeo rohita* exposed to zinc. *Ind. J. Comp. Anim. Physiol.* 4, 79–84.
- Bittanszky, A., Uzing, N., Gyulai, G., Mathis, A., Junge, R., Villarroel, M., et al. (2016). Nutrient supply of plants in aquaponic systems. *Ecocycles* 2, 17–20. doi: 10.19040/ecocycles.v2i2.57
- Brungs, W. A. (1969). Chronic toxicity of zinc to the fathead minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. *Trans. Am. Fish. Soc.* 2, 272–279. doi: 10.1577/1548-8659(1969)98[272:CTOZTT]2.0.CO;2
- Burton, D. T., Jones, A. H., and Cairns, J. (1972). Acute zinc toxicity to rainbow trout (*Salmo gairdneri*): confirmation of the hypothesis that death is related to tissue hypoxia. *J. Fish. Res. Board Can.* 29, 1463–1466. doi: 10.1139/f72-225
- Chavan, V. R., and Muley, D. V. (2014). Effect of heavy metals on liver and gill of fish *Cirrhinus mrigala*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3, 277–288. doi: 10.28978/nesciences.868065
- Cherian, M. G., and Nordberg, M. (1983). Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology* 28, 1–15. doi: 10.1016/0300-483X(83)90101-4
- Chidiebere, E. E. (2019). Acute toxicity of copper and zinc and their lethal concentration on *Clarias gariepinus* (cat fish). *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 17, 13160–13166. doi: 10.26717/BJSTR.2019.17.003076
- Clauss, T. M., Dove, A. D., and Arnold, J. E. (2008). Hematologic disorders of fish. *Veterinary Clinics North America: Exotic Anim. Pract.* 11, 445–462. doi: 10.1016/j.cvex.2008.03.007
- Coetzee, L., Du Preez, H. H., and Van Vuren, J. H. J. (2002). Metal concentrations in *Clarias gariepinus* and *Labeo umbratus* from the Olifants and Klein Olifants River, Mpumalanga, South Africa: Zinc, copper, manganese, lead, chromium, nickel, aluminium and iron. *Water SA* 28, 433–448. doi: 10.4314/wsa.v28i4.4917
- Crafford, D., and Avenant-Oldewage, A. (2011). Uptake of selected metals in tissues and organs of *Clarias gariepinus* (sharp-tooth catfish) from the Vaal River System—Chromium, copper, iron, manganese and zinc. *Water SA* 37 (2), 187–366. doi: 10.4314/wsa.v37i2.65864
- Crespo, S., and Blasch, J. (1980). Mortality, accumulation, and distribution of zinc in the gill system of the dogfish following zinc treatment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol. (United States)* 24, 940–944. doi: 10.1007/BF01608215
- Da Silva Cerozi, B. (2020). Fulvic acid increases iron bioavailability in aquaponic systems: theoretical designs and practical considerations to prevent iron deficiency in plants. *Aquacultural Eng.* 90, 102091. doi: 10.1016/j.aquaeng.2020.102091
- Davis, F. M., Kimball, A., den Dekker, A., Joshi, A. D., Boniakowski, A. E., Nysz, D., et al. (2019). Histone methylation directs myeloid *TLR4* expression and regulates wound healing following cutaneous tissue injury. *J. Immunol.* 202, 1777–1785. doi: 10.4049/jimmunol.1801258
- Duran, S., and Erdem, C. (2014). Effects of sublethal concentration of copper, zinc and cadmium, applied singly and in mixture, on some hematological parameters of *Oreochromis niloticus* (L. 1758). *Fresen Environ. Bull.* 22, 2977–2980.
- Duran, S., Tunçsoy, M., Yeşilbudak, B., Ay, Ö., Cici, B., and Erdem, C. (2015). Metal accumulation in various tissues of *Clarias gariepinus* exposed to copper, zinc, cadmium and lead singly and in mixture. *Fresenius Environ. Bull.* 24, 4738–4742.
- Eisler, R. (1993). *Zinc hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Biological Report Fish and Wildlife Service, Report No. 10* (Washington DC, USA: US Department of Interior), 45.
- Ezeonyejiaku, C. D., Obiakor, M. O., and Ezenwelu, C. O. (2011). Toxicity of copper sulphate and behavioral locomotor response of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and catfish (*Clarias gariepinus*) species. *Online J. Anim. Feed Res.* 1, 130–134. doi: 10.5555/20123128298
- Ezeonyejiaku, C. D., Obiakor, M. O., Ezenwelu, C. O., and Ugochukwu, G. C. (2010). Lethal influence of zinc exposure to *Clarias gariepinus* (Burchell 1822, pisces, clariidae). *World J. Fish Mar. Sci.* 2, 455–460.
- Ezeonyejiaku, C. D., Obiakor, M. O., Ezenwelu, C. O., and Ugochukwu, G. C. (2012). Lethal influence of zinc exposure to *Clarias gariepinus* (Burchell 1822, pisces, clariidae). *J. Anim. Sci. Adv.* 2, 177–183.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

- Firat, O., and Kargin, F. (2010). Individual and combined effects of heavy metals on serum biochemistry of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 151–157. doi: 10.1007/s00244-009-9344-5
- Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R. G., et al. (2011). GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature* 480, 557. doi: 10.1038/nature07954
- Gabriel, U. U., Ezeri, G. N. O., and Opabunmi, O. O. (2004). Influence of sex, source, health status and acclimation on the haematology of *Clarias gariepinus* (Burch 1822). *Afr. J. Biotechnol.* 3, 463–467. doi: 10.5897/AJB
- Gatlin, D. M., Phillips, H. F., and Torrans, E. L. (1989). Effects of various levels of dietary copper and zinc on channel catfish. *Aquaculture* 76, 127–134. doi: 10.1016/0044-8486(89)90257-3
- Goddek, S., Joyce, A., Kotzen, B., and Burnell, G. M. (2019). *Aquaponics food production systems: combined aquaculture and hydroponic production technologies for the future* (Switzerland: Springer Nature), 619. doi: 10.1007/978-3-030-15943-6
- Günther, V., Lindert, U., and Schaffner, W. (2012). The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* 1823, 1416–1425. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.005
- Hanika, S., and Kramer, B. (2000). Electrosensory prey detection in the African sharp-toothed catfish, *Clarias gariepinus* (Clariidae), of a weakly electric mormyrid fish, the bulldog (*Marcusenius macrolepidotus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 48, 218–228. doi: 10.1007/s002650000232
- Havixbeck, J. J., and Barreda, D. R. (2015). Neutrophil development, migration, and function in teleost fish. *Biology* 4, 715–734. doi: 10.3390/biology4040715
- Havixbeck, J. J., Rieger, A. M., Wong, M. E., Hodgkinson, J. W., and Barreda, D. R. (2016). Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. *J. Leucocyte Biol.* 99, 241–252. doi: 10.1189/jlb.3HI0215-064R
- Heath, A. G. (1995). Osmotic and ionic regulation. *Water pollut. Fish Physiol.* 19, 107–131. doi: 10.1201/9780203718896-7
- Hildebrand, M. C., Rebl, A., Nguinkal, J. A., Palm, H. W., and Baßmann, B. (2023). Effects of Fe-DTPA on health and welfare of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Water* 15, 299. doi: 10.3390/w15020299
- Hockett, J. R., and Mount, D. R. (1996). Use of metal chelating agents to differentiate among sources of acute aquatic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (10), 1687–1693. doi: 10.1002/etc.5620151006
- Hogstrand, C., Balesaria, S., and Glover, C. N. (2002). Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish species, the rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 133, 523–535. doi: 10.1016/S1096-4959(02)00125-2
- Homoki, D., Minya, D., Kovács, L., Molnár, Á., Balogh, K., Bárony, P., et al. (2020). Comparison of the technological background of aquaponic systems. *Acta Agraria Debreceniensis* 1, 47–52. doi: 10.34101/actaagrar/1/4511
- Huang, Y. C., Shih, H. Y., Lin, S. J., Chiu, C. C., Ma, T. L., Yeh, T. H., et al. (2015). The epigenetic factor Kmt2a/Mll1 regulates neural progenitor proliferation and neuronal and glial differentiation. *Dev. Neurobiol.* 75, 452–462. doi: 10.1002/dneu.22235
- Ichikawa, S., Fujiwara, T., Saito, K., Fukuhara, N., Yokoyama, H., Hatta, S., et al. (2021). A novel case of $\gamma\delta$ T cell leukemia with recurrent genetic abnormalities accompanied by agranulocytosis. *Ann. Hematol.* 100, 2665–2668. doi: 10.1007/s00277-020-04241-w
- Johnson, R., Wolf, J., and Braunbeck, T. (2009). *OECD guidance document for the diagnosis of endocrine-related histopathology of fish gonads* Vol. 96 (Paris: Organization for Economic Co-operation and Development).
- Kaliky, N. A. P. S. B., Setiawati, M., Carman, O., and Utomo, N. B. P. (2019). Effect of zinc (Zn) supplementation on quality and quantity of striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* sperm. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 18, 46–53. doi: 10.19027/jai.18.1.46-53
- Karayakar, F., Seçen, F., and Ciciik, B. (2021). The effects of EDTA on zinc accumulation in tissues of *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758). *Natural Eng. Sci.* 6, 30–38. doi: 10.28978/nesciences.868065
- Kasozi, N., Tandlich, R., Fick, M., Kaiser, H., and Wilhelmi, B. (2019). Iron supplementation and management in aquaponic systems: a review. *Aquaculture Rep.* 15, 100221. doi: 10.1016/j.aqrep.2019.100221
- Kiyani, V., Hosynzadeh, M., and Ebrahimpour, M. (2013). Investigation acute toxicity some of heavy metals at different water hardness. *Int. J. Advanced Biol. Biomed. Res.* 1, 134–142.
- Knaus, U., and Palm, H. W. (2017). Effects of the fish species choice on vegetables in aquaponics under spring-summer conditions in northern Germany (Mecklenburg Western Pomerania). *Aquaculture* 473, 62–73. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.01.020
- Knaus, U., Wenzel, L. C., Appelbaum, S., and Palm, H. W. (2020). Aquaponics (sl) Production of spearmint (*Mentha spicata*) with African catfish (*Clarias gariepinus*) in Northern Germany. *Sustainability* 12, 8717. doi: 10.3390/su12208717
- Krishnasamy, K., Nair, J., and Bäuml, B. (2012). Hydroponic system for the treatment of anaerobic liquid. *Water Sci. Technol.* 65, 1164–1171. doi: 10.2166/wst.2012.031
- Lewis, S. D., and Lewis, W. M. (1971). The effect of zinc and copper on the osmolality of blood serum of the channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, and golden shiner, *Notemigonus crysoleucas* Mitchill. *Trans. Am. Fish. Soc.* 4, 639–643. doi: 10.1577/1548-8659(1971)100<639:TEOZAC>2.0.CO;2
- Linnik, P. N., and Ignatenko, I. I. (2015). Molybdenum in natural surface waters: content and forms of occurrence (a review). *Hydrobiological J.* 51, 13. doi: 10.1615/Hydrobiol.v51.i4.100
- Lloyd, R. (1960). The toxicity of zinc sulphate to rainbow trout. *Ann. Appl. Biol.* 48, 84–94. doi: 10.1111/j.1744-7348.1960.tb03507.x
- Mahboub, H. H., Shahin, K., Zagloul, A. W., Roushdy, E. M., and Ahmed, S. A. (2020). Efficacy of nano zinc oxide dietary supplements on growth performance, immunomodulation and disease resistance of African catfish *Clarias gariepinus*. *Dis. Aquat. Organisms* 142, 147–160. doi: 10.3354/dao03531
- Mallatt, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 42, 630–648. doi: 10.1139/f85-083
- Marimuthu, K., Umah, R., Muralikrishnan, S., Xavier, R., and Kathiresan, S. (2011). Effect of different feed application rate on growth, survival and cannibalism of African catfish, *Clarias gariepinus* fingerlings. *Emirates J. Food Agric.* 23, 330–337.
- Midorikawa, O., and Eder, M. (1962). Vergleichende histochemische Untersuchungen über Zink im Darm. *Z. für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abt. Histochemie* 2, 444–472. doi: 10.1007/BF00736501
- Molokwu, C. N., and Okpokwasili, G. C. (2002). Effect of water hardness on egg hatchability and larval viability of *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Int.* 10, 57–64. doi: 10.1023/A:1021395122919
- Montaser, M., Mahfouz, M. E., El-Shazly, S. A., Abdel-Rahman, G. H., and Bakry, S. (2010). Toxicity of heavy metals on fish at Jeddah coast KSA: Metallothionein expression as a biomarker and histopathological study on liver and gills. *World J. Fish Mar. Sci.* 2, 174–185.
- Mulisch, M. (2015). “Präparation für die konventionelle Rasterelektronenmikroskopie (REM),” in *Romeis-Mikroskopische Technik* (Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg), 145–152. doi: 10.1007/978-3-642-55190-1_8
- Neocleous, D., Nikolaou, G., Ntatsi, G., and Savvas, D. (2020). Impact of chelated or inorganic manganese and zinc applications in closed hydroponic bean crops on growth, yield, photosynthesis, and nutrient uptake. *Agronomy* 10, 881. doi: 10.3390/agronomy10060881
- Niyogi, S., and Wood, C. M. (2006). Interaction between dietary calcium supplementation and chronic waterborne zinc exposure in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 143, 94–102. doi: 10.1016/j.cbpc.2005.12.007
- Nugegoda, D., and Rainbow, P. S. (1988). Effect of a chelating agent (EDTA) on zinc uptake and regulation by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 68, 25–40. doi: 10.1017/S0025315400050074
- Oloade, I. A., and Ogini, O. (2009). Behavioural and hematological effects of zinc on African catfish, *Clarias gariepinus*. *Int. J. Fisheries Aquaculture* 1, 22–27.
- Onuegbu, C. U., Aggarwal, A., and Singh, N. B. (2018). ZnO nano - particles as feed supplement on growth performance of cultured African catfish fingerlings. *J. Sci. Ind. Res.* 77, 213–218.
- Păpuc, T., Petrescu-Mag, I. V., Gavriloiu, C., Botha, M., Kovacs, E., and Coroian, C. O. (2019). Swimming in the mud-a short review of environmental parameter ranges tolerated by *Clarias gariepinus*. *Extrem. Life Biospeol. Astrobiol.* 11, 9–17.
- Rakocy, J. E. (2012). Aquaponics—integrating fish and plant culture. *Aquaculture production Syst.*, 344–386.
- Reddy, C. N., and Patrick, W. H. Jr. (1977). Effect of redox potential on the stability of zinc and copper chelates in flooded soils. *Soil Sci. Soc. America J.* 41, 729–732. doi: 10.2136/sssaj1977.03615995004100040023x
- Ricker, W. E. (1973). Linear regressions in fishery research. *J. fisheries board Canada* 30, 409–434. doi: 10.1139/f73-072
- Roméo, M., Siau, Y., Sidoumou, Z., and Gnassia-Barelli, M. (1999). Heavy metal distribution in different fish species from the Mauritania coast. *Sci. Total Environ.* 232, 169–175. doi: 10.1016/S0048-9697(99)00099-6
- Roques, J. A., Schram, E., Spanings, T., van Schaik, T., Abbink, W., Boerrigter, J., et al. (2015). The impact of elevated water nitrite concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture Res.* 46, 1384–1395. doi: 10.1111/are.2015.46.issue-6
- Rose, S., Vincent, S., Meena, B., Suresh, A., and Mani, R. (2014). Metallothionein induction in fresh water catfish *Clarias gariepinus* on exposure to cadmium. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6, 377–383.
- Rümke, C. L., and Klein, Z. (1987). Statistische Betrachtungen über die Genauigkeit der Differenzierung und der Zählung von Leukozyten. *Z. Klin. Med.* 42, 173.
- Schram, E., Roques, J. A., Abbink, W., Spanings, T., De Vries, P., Bierman, S., et al. (2010). The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 306, 108–115. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.06.005
- Schram, E., Roques, J. A., Abbink, W., Yokohama, Y., Spanings, T., de Vries, P., et al. (2014). The impact of elevated water nitrate concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture Res.* 45, 1499–1511. doi: 10.1111/are.12098
- Seibel, H., Baßmann, B., and Rebl, A. (2021). Blood will tell: what hematological analyses can reveal about fish welfare. *Front. Veterinary Sci.* 8. doi: 10.3389/fvets.2021.616955

- Shuhaimi-Othman, M., Yakub, N., Ramle, N. A., and Abas, A. (2015). Comparative toxicity of eight metals on freshwater fish. *Toxicol. Ind. Health* 31, 773–782. doi: 10.1177/0748233712472519
- Shukla, V., Dhankhar, M., Prakash, J., and Sastry, K. V. (2007). Bioaccumulation of Zn, Cu and Cd in *Channa punctatus*. *J. Environ. Biol.* 28, 395.
- Skidmore, J. (1970). Respiration and osmoregulation in rainbow trout with gills damaged by zinc sulphate. *J. Exp. Biol.* 52, 481–494. doi: 10.1242/jeb.52.2.481
- Sonneveld, C., Voogt, W., Sonneveld, C., and Voogt, W. (2009). *Plant nutrition in future greenhouse production* (Dordrecht: Springer Netherlands), 393–403. doi: 10.1007/978-90-481-2532-6_17
- Sorensen, E. M. (1991). *Metal Poisoning in Fish* (Florida: CRC Press).
- Spry, D. J., and Wood, C. M. (1984). Acid-base, plasma ion and blood gas changes in rainbow trout during short term toxic zinc exposure. *J. Comp. Physiol. B* 154, 149–158. doi: 10.1007/BF00684139
- Srivatava, N. K., and Prakash, S. (2019). Effect of zinc on the histopathology of gill, liver and kidney of fresh water catfish, *clarias batrachus* (Linn.). *Int. J. Biol. Innov.* 1, 8–13. doi: 10.46505/IJBI.2019.1102
- Stathopoulou, P., Tsoumalakou, E., Levizou, E., Vanikiotis, T., Zaoutsos, S., and Berillis, P. (2021). Iron and potassium fertilization improve rocket growth without affecting tilapia growth and histomorphology characteristics in aquaponics. *Appl. Sci.* 11, 5681. doi: 10.3390/app11125681
- Strauch, S. M., Wenzel, L. C., Bischoff, A., Dellwig, O., Klein, J., Schüch, A., et al. (2018). Commercial African catfish (*Clarias gariepinus*) recirculating aquaculture systems: Assessment of element and energy pathways with special focus on the phosphorus cycle. *Sustainability* 10, 1805. doi: 10.3390/su10061805
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1366–1375. doi: 10.1016/j.dci.2011.07.002
- Tuncay, E., Bilginoglu, A., Sozmen, N. N., Zeydanli, E. N., Ugur, M., Vassort, G., et al. (2011). Intracellular free zinc during cardiac excitation–contraction cycle: calcium and redox dependencies. *Cardiovasc. Res.* 89, 634–642. doi: 10.1093/cvr/cvq352
- Tunçsoy, M., and Erdem, C. (2014). Accumulation of copper, zinc and cadmium in liver, gill and muscle tissues of *Oreochromis niloticus* exposed to these metals separately and in mixture. *Fresenius Environ. Bull.* 23, 1143–1149.
- Tyson, R. V., Simonne, E. H., White, J. M., and Lamb, E. M. (2004). Reconciling water quality parameters impacting nitrification in aquaponics: the pH levels. *Proc. Florida State Hortic. Soc.* 117, 79–83.
- Van de Nieuwegiessen, P. G., Boerlage, A. S., Verreth, J. A., and Schrama, J. W. (2008). Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 115, 233–243. doi: 10.1016/j.applanim.2008.05.008
- Van de Nieuwegiessen, P. G., Olwo, J., Khong, S., Verreth, J. A., and Schrama, J. W. (2009). Effects of age and stocking density on the welfare of African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. *Aquaculture* 288, 69–75. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.11.009
- Van Rensbrug, E. L. (1989). *Die Biokonsentrering van Artrasien, Sink en Yster in Tilapia sparmanii (Cichlidae). Ongepubliseerde M.Sc. Verhandelng* (Suid Afrika: Rand. Afr. Univ.), 74–105.
- Viljoen, A., Steyn, G. J., Van Vuren, J. H. J., and Wade, P. W. (2003). Zinc effects on the embryos and larvae of the sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 1022–1027. doi: 10.1007/s00128-003-0085-2
- Watanabe, T., Kiron, V., and Satoh, S. (1997). Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151, 185–207. doi: 10.1016/S0044-8486(96)01503-7
- Wenzel, L. C., Berchtold, E., and Palm, H. W. (2022). Effects of stocking density and grading on behaviour, cannibalism and performance of African catfish (*Clarias gariepinus*) fry. *Aquaculture Rep.* 27, 101400. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101400
- Wenzel, L. C., Strauch, S. M., Eding, E., Presas-Basalo, F. X., Wasenitz, B., and Palm, H. W. (2021). Effects of dissolved potassium on growth performance, body composition, and welfare of juvenile african catfish (*Clarias gariepinus*). *Fishes* 6, 11. doi: 10.3390/fishes6020011
- Wimmer, U., Wang, Y., Georgiev, O., and Schaffner, W. (2005). Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. *Nucleic Acids Res.* 33, 5715–5727. doi: 10.1093/nar/gki881
- Wood, C. M. (2017). “Toxic responses of the gill,” in *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts* (London: CRC Press), 1–89.
- Xu, L., Ziethen, C. J., Appelbaum, S., Palm, H. W., and Knaus, U. (2022). Aquaponics Production of Wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) in Different Horticultural Substrates with African Catfish (*Clarias gariepinus*) in Northern Germany. *AgriEngineering* 4, 1076–1094. doi: 10.3390/agriengineering4040067
- Yang, T., and Kim, H. J. (2019). Nutrient management regime affects water quality, crop growth, and nitrogen use efficiency of aquaponic systems. *Scientia Hortic.* 256, 108619. doi: 10.1016/j.scienta.2019.108619
- Yep, B., and Zheng, Y. (2020). Potassium and micronutrient fertilizer addition in a mock aquaponic system for drug-type Cannabis sativa L. cultivation. *Can. J. Plant Sci.* 101, 341–352. doi: 10.1139/cjps-2020-0107
- Zhang, C., Song, C., Liu, T., Tang, R., Chen, M., Gao, F., et al. (2017). KMT2A promotes melanoma cell growth by targeting hTERT signaling pathway. *Cell Death Dis.* 8, e2940–e2940. doi: 10.1038/cddis.2017.285
- Zheng, D., Kille, P., Feeney, G. P., Cunningham, P., Handy, R. D., and Hogstrand, C. (2010). Dynamic transcriptomic profiles of zebrafish gills in response to zinc supplementation. *BMC Genomics* 11, 1–19. doi: 10.1186/1471-2164-11-553
- Zheng, J. L., Luo, Z., Chen, Q. L., Liu, X., Liu, C. X., Zhao, Y. H., et al. (2011). Effect of waterborne zinc exposure on metal accumulation, enzymatic activities and histology of *Synechogobius hasta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1864–1873. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.06.018

Article

Effects of Fe-DTPA on Health and Welfare of the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)

Marc-Christopher Hildebrand ^{1,*}, Alexander Rebl ², Julien Alban Nguinkal ², Harry Wilhelm Palm ¹
and Björn Baßmann ¹

¹ Department of Aquaculture and Sea-Ranching, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, University of Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 6, 18059 Rostock, Germany

² Fish Genetics Unit, Institute of Genome Biology, Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), 18196 Dummerstorf, Germany

* Correspondence: marc-christopher.hildebrand@uni-rostock.de; Tel.: +49-(0)381-498-3745

Abstract: Fingerlings (0.23 g) and juveniles (267.04 g) of African catfish (*Clarias gariepinus*) were reared for 32 days under experimental aquarium conditions and were exposed to either 0.75 mg/L or 3.0 mg/L diethylenetriaminepentaacetic acid-iron(II) (Fe-DTPA) and 3.0 mg/L or 12.0 mg/L Fe-DTPA in the water, respectively. These treatment groups were compared to a control group without additional Fe-DTPA. The growth, mortality, ethological indicators (activity, agonistic interactions, air-breathing), leukocyte distribution, histopathological changes in liver and gills, and genetic biomarkers were evaluated for each group. While the growth, mortality, and behavior were not significantly different between the groups, the lymphocyte count in the fish's blood increased significantly in all groups during the course of the experiment, but independently from the treatments. A similar trend ($p > 0.05$) was observed in monocytes. The number of granulocytes decreased significantly, but independently from the treatments. These changes indicated the possibility of an ongoing immune response in the fish from all treatments that might be caused by the increasing aggressive behavior of the fish. However, the Fe-DTPA treatments did not cause a notable suppression or enhancement of the immune reactions. Fe³⁺ accumulations in liver tissues were detected at the tested concentrations, and further changes occurred in the cells of the gills. Gene-expression biochips were used to simultaneously quantify the transcript levels of 34 genes associated with iron metabolism and stress physiology in head kidney samples. The obtained gene-expression profiles did not reveal any significant differences across either the different treatments or the time points. The results indicate that Fe-DTPA supplementation in the tested concentrations can be considered relatively harmless for the health and welfare of African catfish.

Keywords: aquaponics; fertilizer; fish histopathology; fish immunology; toxicity



Citation: Hildebrand, M.-C.; Rebl, A.; Nguinkal, J.A.; Palm, H.W.; Baßmann, B. Effects of Fe-DTPA on Health and Welfare of the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Water* **2023**, *15*, 299. <https://doi.org/10.3390/w15020299>

Academic Editor: José Luis Sánchez-Lizaso

Received: 29 November 2022

Revised: 5 January 2023

Accepted: 9 January 2023

Published: 11 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Nowadays, fish come into contact with various fertilizer components such as organic acids or metal compounds (often bound in chelate complexes) from different sources. These can be wastewater from the chemical industry, fertilizer inputs from agriculture or emissions from mining activities into natural water bodies or outdoor aquacultures.

In the combined farming of fish and plants, known as aquaponics, the addition of fertilizers can provide the plants with all the essential nutrients for optimum plant growth and thus increase yield. Aquaponics is generally considered a very sustainable production method [1] as it reuses the nutrient-rich water from aquaculture to grow plants. In particular, nitrate and phosphate can be used in a resource-efficient way, and water can be saved [2–4]. However, the linkage to aquaculture cannot provide all the essential nutrients for the plants, so supplementing with selective fertilizers is often required [1,4]. Plants grown in aquaponics have species-specific requirements for macro- and micro-nutrients. The main

nutrients (nitrogen and phosphorus) are mainly supplied to the crop plants through the aquaculture unit. However, the supply of important micronutrients (such as zinc, iron, manganese, magnesium, calcium, potassium, and sulfur) often remains at a level that is insufficient for the plants [5]. In decoupled aquaponic systems, where the recirculated water is not directly returned to the fish in the aquaculture unit, the required nutrients are often added by spraying them onto the plants [6,7], and the residues in the water are later discarded as the uncertain toxic properties appear to make it unusable for fish farming. This, however, contradicts the sustainability idea of an otherwise circulating aquaponic system with low water consumption. In recent years, however, motivations to better adjust fertilizer concentrations in aquaponic systems to suit both of the production components (fish and plant), and thus further optimize production toward economic efficiency and sustainability, have repeatedly emerged [1,8,9].

Nowadays, a wide range of different trace nutrients is used as fertilizers in aquaponic systems such as Fe^{3+} , Cu^{2+} , B^{3+} , Mo^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , and K^{+} . These can be added to the water either as salts (FeSO_4 , KCl , and KSO_4), chelated compounds (Fe-EDTA , Fe-EDDHA , and Fe-DTPA), or as component in organic acids (Fulvic acids, Fe-arginine , Fe-glycine , and Fe-histidine) [4,8,10–13]. These supplements are often derived from hydroponic fertilizers.

However, unbalanced ratios of nutrients that are important for the plants can also have a negative effect on the health and growth of the fish. Therefore, targeted fertilization and a minimum of control of the nutrient concentrations in the system are crucial. In particular, the concentration limits of micronutrients should be known for the stocked fish species and should not be exceeded. Overdoses of micronutrients can lead to damages of the internal organs, blood diseases, reduction in oxygen uptake capacity, changes in behavior, and even increased mortality. Recent studies on this topic report different negative responses of fish, such as increased mortalities (lethal dose 50% mortality, LD_{50} values) to Fe , Cu , Zn , Ni supplements, such as protein digestion, behavioral responses, alteration in white blood cell counts, reductions in hemoglobin, and mean corpuscular hemoglobin or pathological alterations in the organs [8,10–12,14].

For the African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822), tolerance tests have already been carried out on compatibility with nitrate-phosphorus-potassium (NPK) fertilizers, potassium trace nutrients, and iron sulphates [13,15,16]. Iron (Fe) plays a fundamental role in cell metabolism and is an essential nutrient for both fish and plants. Fe exists in two different oxidative stages (Fe^{2+} and Fe^{3+}). Fe^{2+} is rather unstable and is more frequently present in acidic, reducing conditions, while Fe^{3+} is predominantly present at alkaline pH [17,18]. Fe^{3+} accumulates mainly at the bottom of a rearing tank or in depressions and is not found at the water surface as it is mainly a precipitation product. In finfish, Fe homeostasis is strictly controlled by uptake, as no regulated excretion mechanism for Fe in the body is known. Its insolubility makes Fe^{3+} inaccessible for uptake by fish through the gills, so it is mainly obtained via diet [19–23]. The uptake of Fe^{2+} from the water by the gills is negligible in most fish, as recent evidence has suggested [20,23]. Fe^{2+} transport via a chelate complex (DTPA , diethylenetriaminepentaacetic acid) has also not been excluded [23–25]. Fe uptake in fish relies on many physiological mechanisms and is dependent on extrinsic as well as intrinsic factors that regulate the level required in the body and avoid excess as well as harmful effects [23,26].

In hydroponics, Fe is added in concentrations up to 5.0 mg/L to promote plant growth [5]. A targeted addition of Fe in combination with DTPA , which grants stability, protects the Fe^{2+} of oxidation to insoluble Fe^{3+} and thus enables availability of Fe in the water dependent on the pH value [27]. This also benefits plants as Fe^{2+} ions can better dissolve on the rhizoplane of plant roots, thereby improving plant nutrient uptake [9,28,29].

In aquaponics, the Fe provided by the fish feed and feces is not sufficient to meet the nutrient requirements for optimal plant growth and health (2–5 mg/L) [9,30–32]. According to Strauch et al. [33], the Fe concentration in the process water from African catfish is very low.

The current study aims to evaluate the effects on health and welfare of the African catfish to non-lethal but aquaponic-related concentrations of the chemical chelator agent Fe-DTPA. We assume that Fe-DTPA in concentrations that meet the minimum requirements for aquaponic systems (approx. 4 mg/L) do not have a negative effect on the health and welfare of African catfish. With this assessment, lower concentrations of Fe-DTPA could be therefore used for fertilizer supplementation in coupled aquaponic systems. African catfish fingerlings and juveniles were challenged with different concentrations of Fe-DTPA with an emphasis on modern health and welfare responses. Growth performance, ethological indicators, blood smears, histopathological analysis, and expression of critical genes were recorded to assess possible hazards of Fe fertilization to the fish.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design and System Maintenance

Two experiments were conducted at the aquaculture research facility ‘Fish glass house’ of the University of Rostock, in northern Germany. Each experiment lasted for 32 days. The first experiment (referred to as Exp. A) was designed for fingerlings, whereas the second experiment (referred to as Exp. B) was designed for juveniles. Both the experiments consisted of three separate recirculation systems, each with three tanks (Exp. A: L × W × H: 100 cm × 50 cm × 32 cm; Exp. B: L × W × H: 100 cm × 50 cm × 35 cm) and a filter unit (approx. 450 L each). This resulted in total volumes of 950 L in Exp. A and 1000 L in Exp. B. In Exp. A, the volume of the tanks was limited to about 50 L, each with vertically placed filter mats because of the small number of fish (see below). Exp. B had no restrictions on tank volumes.

To achieve the targeted concentrations of Fe, we used Fe-DTPA containing 7% mass of Fe²⁺ provided by Phygenera Germany (EG No.243-136-8). The fingerlings of Exp. A were exposed to treatments of either 0.75 mg/L (referred to A-FeDTPA-0.75) or 3.0 mg/L Fe-DTPA (referred to A-FeDTPA-3), whereas the juveniles of Exp. B to treatments of either 3.0 mg/L (referred to B-FeDTPA-3) or 12.0 mg/L Fe-DTPA (referred to B-FeDTPA-12). The fertilizer concentration was lower for fingerlings (Exp. A) because they were more vulnerable. The treatment groups in each of the experiments were compared with a control group without Fe-DTPA addition (referred to FeDTPA-0) and with a total iron concentration of 0.062 mg/L.

In order to keep the concentrations of Fe-DTPA in the water stable, a dosing computer (Profilux4, GHL) and a dosing pump (Doser3, GHL) were used. For adjustment, a prepared Fe-DTPA solution was slowly added to the water cycle within the sump. Water exchange was performed after 2 weeks, replacing 10% of the total volume.

The respective needs of its mass were calculated by a modified formular according to Latimer [34]:

$$\frac{C_w \cdot D_f}{F \cdot C} \cdot V_k = m \quad (1)$$

C_w = targeted concentration (mg/L)

D_f = dilution factor (1)

F = percentage element concentration of the fertilizer (%)

C = conversions constant from imperial to the metric system (mg)

V_k = total processed volume (L)

m = fertilizer mass (g).

The volumetric standard solutions (3000 and 6000 mg/L) were assessed to initiate the fertilizer solution of the treatments. The respected volumes were then calculated by using a known dilution formula (see below). The resulting volumes were processed by the dosing unit with an error of 1.0 mL per 500 mL.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (2)$$

C_1 = concentration of standard solution (mg/L)

V_1 = volume of the standard solution (L)

C_2 = targeted concentration in the system (mg/L)

V_2 = needed intake of standard solution (L).

The water quality parameters (temperature, pH, dissolved oxygen (DO), electric conductivity (EC), and redox potential) were measured daily using a portable multimeter (HQ40, Hach Lange). In a three-day interval, water samples were taken from the sumps to analyze nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-), ammonium (NH_4^+), and ortho-phosphate (PO_4^{2-}) using an autoanalyzer (Gallery™, Automated Photometric Analyzer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The total Fe concentrations were determined using Hach-Lange cuvette tests (LCK321 & LCK521) and by performing acid digestion (LCW902) via a separate photometer (DR3900 RFID Spectrophotometer, Hach-Lange, Iowa Ames, IA, USA). If the iron concentrations differed from the targeted concentrations, additional Fe-DTPA solution was added.

2.2. Fish Stocking and Feeding

For both the experiments, 288 African catfish were obtained from a local fish hatching company (PAL Aquaculture GmbH, Kiel, Germany). The fingerlings of Exp. A were stocked with 14 fish per 50 L (3.6 fish/L), with mean weights of 0.23 ± 0.04 g and mean lengths of 3.0 ± 0.14 cm, into the nine tanks. The number of experimental animals was reduced as much as possible so that few animals would be stressed. The juveniles of Exp. B were stocked with 18 fish per 120 L (6.7 fish/L), with mean weights of 267.04 ± 54.93 g and mean lengths of 31.0 ± 2.94 cm, into the nine tanks. All the fish were acclimated for 9 days in untreated water before they were exposed to the different concentrations of Fe-DTPA.

During the experiment, the fish were fed using a commercial catfish diet (Exp. A: Coppens Start Premium 0.3–1.5 mm; Exp. B: Coppens Special Premium 5.0 mm). To avoid high nutrient loads, the calculated feed amounts were set for fingerlings with 3% and for the juveniles with 0.7% of their mean bodyweight, respectively. The corresponding daily feed amount was divided by the number of feeding events per day since the fingerlings were fed four times (at 0, 6, 12, and 18 pm), whereas the juveniles were fed only once (at 12 pm). In Exp. A, during the experimental period of 32 days, 13 g per tank were fed; in Exp. B 60 g were fed.

The feed conversion ratio (FCR) was calculated with:

$$\frac{TFI}{(W_1 - W_0)} = \text{FCR} \quad (3)$$

TFI = total feed intake (g)

W_0 = initial fish weight (g)

W_1 = final fish weight (g).

2.3. Sampling

In Exp. A, all the fish in each tank were caught and subsequently weighed and had their lengths measured on days 11, 12, 21, and 32 to monitor their weekly growth performance. Afterwards, the fish were returned to their respective rearing tanks. In Exp. B, on days 11, 12, 21, and 32, three juvenile fish were taken from each group, stunned by brain percussion and killed by puncture of the heart. The weight and length of each individual fish was measured. Fish sampled on days 11, 12, 21 and 32 were additionally investigated for their possible genetical response to Fe-DTPA, and on days 11, 21, and 32, for alterations in their blood. After 32 days, as each experiment ended, all individuals were counted, measured, and killed.

Fulton's condition factor (CF) was estimated regarding to Ricker [35]:

$$\frac{100 \cdot W}{L^3} = \text{CF} \quad (4)$$

CF = Fulton's condition factor

W = weight (g)

L = length (cm).

All treatments were carried out in accordance with the EU guidelines for animal experiments and were approved by the relevant ethics committee.

2.4. Blood Smear Analysis and Skin Lesion Documentation

In Exp. B, on days 11, 21, and 32, blood samples of approx. 5 mL were taken from the caudal vessels of the fish and transferred to a cooled EDTA tube (BD Vacutainer, K2E 5.4 mg). Three hours later, blood smear preparations were created from 50 μ L of blood and dyed according to Pappenheim [36]. The samples were then fixed within Canada balsam in order to evaluate the immune fitness by cell type distribution by a leucogram. These preparations were analyzed under a light microscope (Olympus BX 53, application software Cellsens, v. 1.5) using a 500 $\times$ magnification. To arrange a differential blood count for a specific group, 100 cells per blood smear were counted, and the leucocyte cell types were determined. This process was repeated five times; according to Rümke et al. [37], this increased the statistical accuracy. The means of the respective groups were then calculated, which included the cell counts of three samples from a given group.

Neutrophile cell classification was conducted according to Ainsworth et al. [38], who had reported these classifications in various fish species, including African catfish. Precursor cells were determined according to Clauss et al. [39]. From the three types of granular leucocytes found in mammals, only neutrophils and eosinophils are found in *C. gariepinus*. The series of neutrophilic granular leucocytes consist of the neutrophilic progranulocytes, neutrophilic meso-granulocytes, neutrophilic meta granulocytes, and mature and aged neutrophilic granulocytes. The proportion development stages for neutrophilic granulocytes allows a small look into an upcoming inflammation reaction of a fish [39]. Other leucocyte types (lymphocytes, monocytes, and eosinophile) were determined according to Boomker [40].

In Exp. B, the number and area of skin lesions were recorded for each sampled fish. To determine the lesion area, a clear template with a 0.25 cm² grid was placed over each lesion and the smallest possible lesion area was recorded. All lesion areas per fish were then summed. In Exp. A, this was not performed because the fish were too small in size.

2.5. Histological Analysis

When sampling the fish in Exp. B, special attention was paid to different organs to investigate toxicity. Liver tissue was dissected by cutting off a 5 mm³ cube from the middle area of the liver. Gill tissue (1 cm) was taken from the outer left branchial arch. Both the organs were preserved in 15% formalin/5% methanol and stored at 8 °C. In addition, the upper part of the head kidney from days 11, 12, 21, and 32 was dissected and stored at −80 °C for gene expression analysis. The tissue samples of liver and gill samples were washed and fixed in a histokinette by 100% ethanol and an embedding agent (Histosec 56–58, Merk, New York, NY, USA), respectively. Preparations were then embedded in blocks of paraffin and cut into 1 μ m thick cross-sections on a microtome. Subsequent staining solutions for Fe³⁺ and Fe²⁺ (Prussian blue and Turnbull's blue) were prepared according to Mulisch [36] and used in the dying process through an automated staining bench (ST5010-CV5030, Leica, Wetzlar, Germany). Crated histopathological samples were analyzed using a scanning microscope (Leica DM4 B, application software LAS X, v. 5.02). Images were assessed and severity grading was conducted according to Johnson et al. [41]. The following grades were defined: (G0), not remarkable (no findings associated with a particular diagnostic criterion); (G1), minimal (inconspicuous to barely noticeable, fewer than 2 occurrences per microscopic field); (G2), mild (noticeable feature of the tissue, 3–5 occurrences per microscopic field); (G3), moderate (dominant feature of the tissue, 6–8 occurrences per microscopic field); (G4), severe (overwhelming feature of the tissue, more than 9 occurrences per microscopic field).

2.6. RNA Isolation, Primer Design and Multiplex Quantitative PCR

A list of genes related to Fe homeostasis and general stress responses was identified based on a comprehensive literature research. In addition, we derived primer sequences from traditionally chosen reference genes (*rna18s*, *rpl*, *actb*, *gapdh*) [42] that proved stable transcript abundances across different treatment groups in previous investigations on fish [43]. The sequence information for the reference-gene orthologs in African catfish was available at the NCBI nucleotide database. To identify the orthologous target genes from African catfish we searched against our *C. gariepinus* genome (NCBI accession codes GCA_024256425, GCA_024256435, GCA_024256465) obtained with Oxford Nanopore PromethION, PacBio Sequel, Illumina NovaSeq and Illumina HiSeq Illumina RNA-seq technologies. Reciprocal BLASTs against the NCBI nucleotide database were performed confirming the identity of the obtained *C. gariepinus* sequence fragments. If we could not identify any ortholog sequence from *C. gariepinus*, the respective orthologs of close catfish relatives, including *Ictalurus punctatus*, *Pangasianodon hypophthalmus*, and *Silurus meridionalis*, were utilized. The verified sequence fragments were imported into Pyrosequencing Assay Design software (version 1.0.6; Biotage, Uppsala, Sweden) to predict optimal primer oligonucleotides specific for African catfish with a primer score ≥ 85 to amplify target fragments between 20 and 23 bp (Table 1). All primer-pair assays were tested on a diverse array of tissue samples (brain, gills, gonads, head kidney, intestine, liver, muscle, skin, and spleen) before measurement to validate the proper amplification of target-gene fragments. For these tests, the LightCycler 96 System (Roche, Mannheim, Germany) along with the SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline/Meridian Bioscience, Memphis, TN, USA) was used. Melting curve analyses and agarose gel electrophoresis validated the amplification of specific PCR products with the targeted length. Thirty-eight assays passed the pre-tests (Table 1) and were used to profile the expression of selected genes in the samples from the above experiment.

The total RNA from the head kidneys of the treated and control fish ($n = 3$ per group) was extracted using 1 mL TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) and subsequently purified with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Residual DNA was digested using the RNase-free DNase I (Qiagen) for 12 min at 37 °C. The concentration and the purity of the extracted RNA were assessed using the NanoDrop OneC spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

The integrated fluidic circuit (IFC) technology from Standard BioTools Gene Expression biochips was used to profile the expression of 34 target genes and 4 reference genes (*rna18s*, *rpl*, *actb*, *gapdh*) in the extracted RNA specimens from all the Exp. B groups. The multiplex quantitative PCR (qPCR) analyses were performed on a 48.48 IFC chip (Standard BioTools, San Francisco, CA, USA) using the BioMark HD system (Standard BioTools). To this end, we adjusted the total RNA at a concentration of 10 ng/ μ L and reverse-transcribed 1 μ L (42 °C, 30 min) using the Reverse Transcription Master Mix (Standard BioTools). The resulting cDNA aliquots were mixed with primers (100 μ M) and the PreAmp master mix (Standard BioTools) and individually preamplified in 15 cycles (95 °C, 15 s; 60 °C, 4 min) in a TAdvanced thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). After this preamplification step, exonuclease I (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) was added to degrade single-stranded oligonucleotide primers. After a 30 min incubation period at 37 °C, 43 μ L TE buffer (Sigma, Kawasaki, Japan) was added per sample. Each 50- μ L-cDNA sample was diluted in SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and 20 $\times$ DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Standard BioTools) to produce the sample mixes. After priming the 48.48-IFC chips in the MX Controller (Standard BioTools), the primers and the sample mixes, along with one no-template (water) control, were transferred to the assay and sample inlets on two primed 48.48-IFC chips. Finally, multiplex qPCR was conducted following the manufacturer's thermal protocol 'GE Fast 48.48 PCR+Melt v2.pcl'.

Table 1. Oligonucleotide-primer sequences derived from *Clarias gariepinus*, *Ictalurus punctatus* or *Pangasianodon hypophthalmus*.

Gene Symbol	Gene Product	Function	Sense Primer (5'→3'), Antisense Primer (5'→3')	Source (Species; Accession Code)	Fragment Length (bp)	PSQ Score
Reference genes:						
<i>rna18s</i>	18S ribosomal RNA	Structure of eukaryotic ribosomes	CTCTGCTGGACGATGGCTTAC, TCGATGAAGAACGCAGCCAGC	<i>C. gariepinus</i> ; GQ465239	94	100
<i>actb</i>	Actin-beta	Cell structure and motility, intercellular signaling	ACCACCACAGCCGAGAGAGAA, CTTCCAGCCATCTTCTCTGGT	<i>C. gariepinus</i> ; EU527191	204	86
<i>gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Carbohydrate metabolism	TATGAAGCCCGCTGAGATCCC, GCCTCTTCTCACTGCAGGGT	<i>C. gariepinus</i> ; AF323693	106	99
<i>rpl</i>	Ribosomal protein, large subunit	Structure of eukaryotic ribosomes	ACTAAATAGCAACTGATCCCTATC, GAATATCTGACCACTAAGATCCG	<i>C. gariepinus</i> ; MW080924	134	96
Target genes:						
<i>atp6v1g1</i>	ATPase H+ transporting v1 subunit g1	Intercellular Fe homeostasis	CGGAAAAACCGCCGCTTGAAG, GACCAAGGAAGCCGCGGCAC	<i>P. hypophthalmus</i> ; XM_026922532	106	84
<i>c3a</i>	Complement component 3, variant a	Bacteria opsonization and destruction	ATGTCCTTCGATGTCACGGTTTAT, TCGAACCAAGAGTAACGGCATG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017457024	114	93
<i>casp3</i>	Caspase 3	Apoptosis	CTCTTTATCATTCAAGGCTTGTCG, GTACTCTACTGCTCCAGGTTATT	<i>I. punctatus</i> ; XM_017473312	139	95
<i>casp8</i>	Caspase 8	Apoptosis	GTTATCAGCCGAAGCCGCTCA, ATCCAGAGCTATGATGTGTCCG	<i>Cyprinus carpio</i> ; XM_042730675	157	91
<i>ccnb1</i>	Cyclin b1	Control of the G2/M transition phase of the cell cycle	TCAAAAATCGGAGAGGTTACAGC, TGCACTTTGCTCCCTCTCTGG	<i>I. punctatus</i> ; NC_030443	103	91
<i>cp</i>	Ceruloplasmin	Copper transportation, oxidation of iron (Fe ²⁺ to Fe ³⁺)	CCACAACGTTCTAGAAGAATCATA, CTAAGAATGGAGGTCCAACATAAAA	<i>I. punctatus</i> ; JF914943	155	87
<i>cs</i>	Citrate synthase	Aerobic metabolism	GGTGGTGAAGTGTCGATGAAA, GCTATGGGCATGCTGTCCTGA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017487510	94	94
<i>hmox1a</i>	Heme oxygenase 1	Cellular response to xenobiotic stimulus	GATTCTTCTGTGTTCCCTGTATG, CCATCTACTTCCCTCAGGAGC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017491622	104	95
<i>hsf</i>	Heat-shock transcription factor 1	ERK signaling, stress response	GTGCAGTCCATCAACTTTGATTC, CTATTCAGGAGTTGCTGTCAGAA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017455240	111	93
<i>hsp90ab1</i>	Heat-shock protein 90 alpha family class b member 1	Chaperone function, stress response	GAACATCAAGCTGGGCATCCAT, TTACTACATCACTGGTGAGAGCA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017456214	167	87
<i>hspb1</i>	Heat-shock protein family b (small) member 1	Differentiation of cell types, stress response	ACAGGACAACCTGGAAGGTGAAC, GATTATCGGAAACCATGAGGAGA	<i>Clarias batrachus</i> ; KT359728	107	97

Table 1. Cont.

Gene Symbol	Gene Product	Function	Sense Primer (5'→3'), Antisense Primer (5'→3')	Source (Species; Accession Code)	Fragment Length (bp)	PSQ Score
<i>hspd1</i>	Heat shock protein family d (hsp60) member 1	Chaperone function, stress response	GCACGCTTGCTCCTCAACAGGTT, AGACATGGCGATTGCTACTGGA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017469365	113	91
<i>igf1</i>	Insulin-like growth factor 1	Anabolism, growth	CGCCCAAAACACCAAAGAAACC, AGTGACGAGAAGAGGAGAGCG	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200295	164	100
<i>il2</i>	Interleukin-2	Activation and proliferation of lymphocytes	GTCGGCCTGGGAAAAAGCCAAT, TTATGTGTTGCACCAGACAACG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017474923	162	95
<i>il4</i>	Interleukin-4	Activation and proliferation of leucocytes	ATGAATCCTTGTTGGAAGATTAGAG, GGAGTATTTGGTGAGAGAGGTAA	<i>P. hypophthalmus</i> ; XM_026924084	108	86
<i>il6</i>	Interleukin-6	Acute-phase response	GCAGTTGAAACGGGACTTCCCA, TGTACCAAGCTTACCTGCCTTA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017455306	162	96
<i>kmt2a</i>	Lysine-specific methyltransferase 2a	Regulation of early development and hematopoiesis	ATTGGGTCGAAATCGTGCTGTAT, ATGATAAGTCTTCAGTGGCAGGT	<i>I. punctatus</i> ; XM_017490460	121	90
<i>mtf1</i>	Metal regulatory transcription factor 1	Catabolic regulation of cartilages	GTAGGAGGGCATTGAGGGAAC, AGTCAGAACGCTGCCCCCTC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017475296	146	90
<i>nkx2-3</i>	NK2 homeobox 3	Cell differentiation	TACAGGACAACCTGGTGGAAAG, ACAACCTCTGGTTTCTGCTCTT	<i>I. punctatus</i> ; XM_017464595	119	89
<i>nr3c1</i>	Nuclear receptor subfamily 3 group c, member 1, glucocorticoid receptor	Stress response	TGTAGAAGGCCAACACAACTATC, GAACCTAGAAAGCACGAAAAACA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017492397	137	94
<i>oser1</i>	Oxidative stress-responsive serine-rich protein 1	Oxidative stress	AACTGGCATGGATGCAGTCGAA, ACCTACTGTAGCTCTAAAATGCAA	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200453	120	93
<i>osgin2</i>	Oxidative stress growth inhibitor	Oxidative stress	AGGAGCCTGGCATGCAATGGA, GTGACCAATGACCGGGCCAC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017467887	129	91
<i>pgm3</i>	Phosphoglucomutase 3	Carbohydrate metabolism	GACACAGGCAGGGCTGAATCT, CTTCGTACAGCACACTGTAACC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017494096	112	94
<i>sirt1</i>	Sirtuin 1	Oxidative stress	AGTGAGGTGCTAGGGTTAATGG, TTGGTTCTTATCGCTTTATTGAGC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017461869	148	91
<i>slc30a5</i>	Solute carrier family 30, member 5	Zinc transportation	AATAGTCACCAAAAAGACAGTGGAT, CATCGTTGTGCTCGAACAACAG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017459891	134	90
<i>slc39a8</i>	Solute carrier family 39, member 8	Cellular zinc uptake, protection from inflammation-related injury and death	TTTAACCTGATCTCAGCCATGTC, TATGTTCCCTGAGATGAATGCCA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017489708	151	93
<i>slc46a1</i>	Solute carrier family 46, member 1	Folate transportation	AATGGCGACATGCACAAGGGTAT, AGAACAGCCTTGCCCCAGGG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017491375	129	88
<i>sp1</i>	SP1 transcription factor	Cell growth, apoptosis, differentiation and immune responses	AGCACAGCAGGTGATCAGGGA, GAGAAGCGTGACATGTCCATA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017450095	119	91
<i>st8sia4</i>	St8 alpha-n-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase	Synthesis of polysialic acid for cell adhesion molecule	GGTTCATGCAGTCAGAGGGTAC, CTTCTGCGATGAGATCCACTTG	<i>C. gariepinus</i> ; PRJNA820763	112	85

Table 1. Cont.

Gene Symbol	Gene Product	Function	Sense Primer (5'→3'), Antisense Primer (5'→3')	Source (Species; Accession Code)	Fragment Length (bp)	PSQ Score
<i>stk39</i>	Serine/threonine kinase 39	Stress response	TGTAGTTGTTGCTGCTAACCTTC, AGATCCCTGACGAGGTGAAGC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017469076	116	89
<i>tlr5</i>	Toll-like receptor 5	Detection of bacteria	GGCAGCATGGGAAAGGGAGTT, GTAAAGGCTCTGGATCTGTCCA	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200229	103	96
<i>tnf</i>	Tumor necrosis factor alpha	Immune/acute-phase response	AAACCAGACGAGACCCAAGAAAT, TCTATGCAGTGGTTCGACAACG	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200172	130	96
<i>ucp2</i>	Uncoupling protein 2	Regulation of production of reactive oxygen species, function of mitochondria	GGCTCCAGATCCAAGGGGAGA, CCACGTAGTCTCTACAACGGG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017489367	131	92
<i>zeb1</i>	Zinc finger e-box binding homeobox 1	Repression of interleukin-2 function	GCAGAGACCAGCGGCATGTAA, ATACGAGTGCCCCAACTGTAAAA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017483097	156	89

2.7. Ethology Analysis

Ethological observations of the fish (including agonistic behavior, air breathing, escape attempts, stereotypy, and swimming activity) were conducted via video recordings in both experiments to determine possible effects of the Fe-DTPA on the fish. The observations were completed on days 8, 18, and 28 of the experiments for 20 min following a standard rotating box model to ensure a systematic recording structure over the periodic recording events. In this model, three tanks from different groups were recorded at the same time, rotating in order from the following session. At the first recording session, no fertilizer was used in order to provide a reference for each group in subsequent sessions. In this way, differences that were caused by the individual composition of the fish stocking could be better identified, if necessary. The first five minutes in each video recording were not evaluated to exclude anthropogenic influences (camera placement or movement in front of the tanks, etc.). An ethogram, according to Van de Nieuwegiessen et al. [44], was slightly modified, and used to evaluate the behavior (Table 2). The fish activity was calculated based on all visible swimming and resting fish within a five-minute interval, followed by counting all swimming and resting individuals and comparing these numbers to the total visible fish.

Table 2. Ethogram, direct observations and video recording [44].

Behavioral Element	Definition
Agonistic behavior	Chasing or biting a fish or being chased by or bitten by another fish.
Air breathing	The fish moves to the water surface and takes a gulp of air. This was checked by escaping air from the gills of the fish when it was swimming back to the bottom of the tank.
Escape attempts	The fish moves to the water surface and its head emerges from the water surface past its gill cover.
Resting	Moving passively through the water or lying still at the bottom of the tank.
Stereotypic behavior	Continuous and compulsive swimming in a fixed, repetitive pattern.
Swimming	Displacement of the body, while browsing, moving, eating and air-breathing.

2.8. Statistics

The statistical analysis was conducted using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 27.0 (IBM Corp., 2020, Armonk, NY, USA). First, the normal distribution and homogeneity of variances of the data were tested by Shapiro and Levene tests. For normal distributed data, a one-way analysis of variance (ANOVA) was conducted. If the data were not normally distributed, a Kruskal–Wallis test was used. If the Levene test indicated inhomogeneous variances, a one-way Welch’s ANOVA was performed. For significances ($p < 0.05$), the post-hoc tests Tukey HSD (ANOVA), Dunnett-T3 (Kruskal–Wallis) or Games–Howell (Welch ANOVA) were conducted. The obtained multiplex qPCR data were analyzed using the RealTime PCR Analysis Software v. 4.5.2 (Standard BioTools) and normalized against the geometric mean of three suitable reference genes (*rna18s*, *actb*, *gapdh*). Those normalized copy numbers of the target genes were then evaluated using one-way ANOVA.

3. Results

3.1. Water Analyses

The mean physicochemical water parameters are given in Table 3. The water temperature and oxygen saturation were constant during both of the experiments ($p > 0.05$). The EC values fluctuated among the treatment groups and showed a maximum within the highest used Fe-DTPA concentrations. These high concentrations (A-FeDTPA-3; B-FeDTPA-12) were significantly different from both the lower concentrations (A-FeDTPA-0.75; B-FeDTPA-3) and the control groups (FeDTPA-0) ($p < 0.05$). In addition, the redox potential decreased mostly with increasing Fe-DTPA. The treatments A-FeDTPA-0.75, A-FeDTPA-3; B-FeDTPA-3, B-FeDTPA-12 differed significantly from respective controls (FeDTPA-0) or (in Exp. A) with lower Fe-DTPA concentration. During Exp. B, the pH values were significantly different between B-FeDTPA-0 and B-FeDTPA-3. In both the experiments,

the NH_4^+ concentrations differed significantly between FeDTPA-0 and FeDTPA-3 ($p < 0.05$). Furthermore, significant differences were found in the different Fe^{3+} and Fe^{2+} contents, which was intended. Thus, for Fe total, there was a significant increase at each increment between treatment groups.

3.2. Growth and Mortality

The initial weights and lengths of the fish were similar ($p > 0.05$) across all the groups within each experiment (Table 4). The final weights, final lengths, and CF were also similar ($p > 0.05$). During Exp. A, there was no mortality. In Exp. B, on the other hand, a few losses occurred ($p > 0.05$) in the tanks, but not regularly. Instead, these fish left their tanks by jumping and died. The percentage of mortalities as well as the actual numbers of fish that died are given in Table 4.

3.3. Fish Behavior

There were no significant changes in the behavior of the fish from the different treatment groups after addition of the Fe-DTPA in either experiment. In Exp. A, only one significant difference was found in the agonistic behavior between the FeDTPA-0.75 and FeDTPA-3 groups, but prior to Fe-DTPA exposure (Table 5). Nevertheless, minor effects were observed in all treatment groups during both the experiments. For instance, increasing air breathing activity was observed in Exp. A, while in Exp. B, a slight increase in agonistic behavior led to elevation in skin lesions. Regarding the skin lesions, it was found that the number increased with the course of the experiment. An exception was the B-Fe-DTPA-12 group, where the number decreased throughout the experiment. Significant differences were found in the B-Fe-DTPA-3 group between day 11 and day 21 as well as day 11 and day 32. Regarding lesion area, there was a significant difference in the B-Fe-DTPA-3 group between days 11 and 32.

3.4. Leucogram

In Exp. B, the total amounts of leucocytes were detected. The percentage distribution of leucocyte cell types is shown in Table 6. The distribution of lymphocytes ranged from $48.92\% \pm 3.27\%$ to $73.63\% \pm 2.65\%$ during the exposition trial. Monocytes were detected between $14.18\% \pm 1.49\%$ and $27.99\% \pm 3.52\%$. A class distribution of known types of granulocytes of the African catfish were calculated as a percentage fraction of the total cell count and ranged from $0.49\% \pm 0.28\%$ to $3.22\% \pm 0.53\%$ (neutrophile meta-granulocytes), $1.12\% \pm 0.34\%$ to $2.64\% \pm 1.18\%$ (neutrophile meso-granulocytes), and $26.63\% \pm 0.64\%$ to $5.54\% \pm 1.12\%$ (mature-neutrophils). Scattered eosinophils were also counted with day 21 onwards. At day 11, major cell types of leucocytes (lymphocytes and monocytes) as well as types of upcoming neutrophilic granulocytes did not differ significantly among the treatments ($p > 0.05$). Only the cell distribution of mature neutrophils was significantly different between the B-FeDTPA-12 and the B-FeDTPA-0 groups, followed by a significant difference in lymphocytes between the B-FeDTPA-3 and the B-FeDTPA-0 groups after 21 days of exposure ($p < 0.05$). Different amounts of monocytes were found between day 11 and day 32 (ANOVA, $p > 0.1$, Dunnett-T3). Over the entire experiment (32 days), cell distribution of mature neutrophils as well as cell types of its precursor states (neutrophilic meta/meso granulocytes) decreased significantly in all three groups ($p < 0.05$).

3.5. Histological Assessment

In Exp. B, the histopathological examination revealed minimal (B-FeDTPA-0 and B-FeDTPA-3, both G1) to mild (B-FeDTPA-12, G2) accumulations of Fe^{3+} within the liver tissue (Figure 1a–c) after 32 days. The cells of the gill filaments of each group showed no Fe-inclusion. However, hypertrophic swelling occurred in the lamellae of the gill filaments, particularly in the B-FeDTPA-3 (G2) and the B-FeDTPA-12 groups. This was not remarkable (G0) in the control group. Hyperplasia was also detected in the B-FeDTPA-12 group after 32 days, which was therefore classified as moderate (G3) (Figure 1d–f).

Table 3. Mean water parameters ($\pm$ standard deviation (SD); n = 22) in Exp. A (fingerlings) and Exp. B (juveniles). In each experiment, means in a row followed by different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) according to Kruskal–Wallis and Dunnett T3, respectively.

Parameters		Exp. A						Exp. B					
		FeDTPA-0	$\pm$ SD	FeDTPA-0.75	$\pm$ SD	FeDTPA-3	$\pm$ SD	FeDTPA-0	$\pm$ SD	FeDTPA-3	$\pm$ SD	FeDTPA-12	$\pm$ SD
Temp.	(°C)	29.80	1.06	29.70	0.78	29.50	1.00	29.00	1.10	28.00	0.61	28.90	0.76
DO	(mg/L)	8.20	0.27	8.10	0.18	8.10	0.19	7.10	0.39	6.80	0.52	6.90	0.36
EC	(μ S/cm)	523.80 ^a	21.70	534.00 ^a	21.86	545.30 ^b	39.35	986.80 ^a	86.69	958.70 ^a	77.87	1058.20 ^b	129.11
Redox	(mV)	190.00 ^a	15.89	151.80 ^b	32.56	122.90 ^c	51.21	169.00 ^a	15.12	126.50 ^b	27.69	128.80 ^b	28.12
pH		8.70	0.07	8.70	0.10	8.70	0.08	6.40 ^a	0.74	7.00 ^b	0.50	6.70 ^c	0.65
NO ₃ [−]	(mg/L)	12.31	2.63	13.02	3.72	13.92	3.95	201.60	78.74	174.95	79.09	185.92	78.13
NO ₂ [−]	(mg/L)	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.28	0.38	0.27	0.30	0.49	0.48
PO ₄ ^{2−}	(mg/L)	1.00	0.37	0.58	0.13	0.65	0.36	6.78	3.37	4.72	2.39	5.84	2.58
NH ₄ ⁺	(mg/L)	0.10	0.09	0.07	0.07	0.08	0.10	2.03 ^a	1.92	0.39 ^b	0.60	0.84 ^c	0.94
Fe ³⁺	(mg/L)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03
Fe ²⁺	(mg/L)	0.06 ^a	0.03	0.58 ^b	0.22	2.36 ^c	0.98	0.07 ^a	0.03	2.24 ^a	1.21	9.00 ^b	4.94
Fe total	(mg/L)	0.08 ^a	0.02	0.59 ^b	0.22	2.37 ^c	0.99	0.09 ^a	0.01	2.25 ^b	1.18	8.99 ^c	4.90

Table 4. Mean growth ($\pm$ standard deviation (SD)) and mortality of *Clarias gariepinus* exposed to different Fe-DTPA concentrations. No significant differences were found.

	Exp. A			Exp. B		
	FeDTPA-0	FeDTPA-0.75	FeDTPA-3	FeDTPA-0	FeDTPA-3	FeDTPA-12
Initial weight (g)	0.229 $\pm$ 0.04	0.217 $\pm$ 0.03	0.171 $\pm$ 0.04	271.43 $\pm$ 12.75	272.82 $\pm$ 20.21	256.87 $\pm$ 19.57
Final weight (g)	2.318 $\pm$ 0.98	2.558 $\pm$ 1.03	2.931 $\pm$ 0.83	270.40 $\pm$ 56.80	315.88 $\pm$ 70.93	286.31 $\pm$ 45.54
Initial length (cm)	3.1 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.1	30.5 $\pm$ 1.8	32.67 $\pm$ 0.5	30.8 $\pm$ 2.8
Final length (cm)	6.3 $\pm$ 1.3	6.6 $\pm$ 1.3	7.0 $\pm$ 0.7	33.7 $\pm$ 1.8	33.5 $\pm$ 2.2	33.3 $\pm$ 2.3
Total feed input (kg)	0.03907	0.03987	0.04702	2.022	2.038	1.971
Condition factor	0.79 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.01	0.81 $\pm$ 0.11	0.77 $\pm$ 0.05	0.8 $\pm$ 0.05
Mortality in % (n)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	11.1 (2)	5.5 (1)	5.5 (1)

Table 5. The mean behavioral responses ($\pm$ standard deviation) of *C. gariepinus* fingerlings (Exp. A) and juveniles (Exp. B) (both with n = 3) exposed to different amounts of Fe-DTPA.

Video and Direct Observations	Exp. A			Exp. B		
	FeDTPA-0	FeDTPA-0.75	FeDTPA-3	FeDTPA-0	FeDTPA-3	FeDTPA-12
Swimming activity (Mean %) day 8	70.70 $\pm$ 9.66	62.22 $\pm$ 24.11	77.38 $\pm$ 6.48	77.67 $\pm$ 8.52	74.88 $\pm$ 7.73	75.53 $\pm$ 5.03
Swimming activity (Mean %) day 18	68.47 $\pm$ 16.82	75.34 $\pm$ 2.93	78.40 $\pm$ 6.00	82.40 $\pm$ 4.50	74.09 $\pm$ 14.70	83.42 $\pm$ 5.04
Swimming activity (Mean %) day 28	69.99 $\pm$ 12.67	80.35 $\pm$ 11.28	74.42 $\pm$ 12.73	78.80 $\pm$ 12.65	79.69 $\pm$ 17.74	86.82 $\pm$ 13.94
Escape attempts (Total frequency) day 8	1 $\pm$ 0.60	0 $\pm$ 0.00	1 $\pm$ 0.60	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00
Escape attempts (Total frequency) day 18	1 $\pm$ 0.60	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00
Escape attempts (Total frequency) day 28	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00	2 $\pm$ 1.20	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00	1 $\pm$ 0.60
Air breathing Index (Total frequency) day 8	0.81 $\pm$ 0.43	0.52 $\pm$ 0.50	0.74 $\pm$ 0.25	6.31 $\pm$ 0.34	5.39 $\pm$ 0.42	6.30 $\pm$ 1.14
Air breathing Index (Total frequency) day 18	1.36 $\pm$ 0.31	1.14 $\pm$ 0.49	1.48 $\pm$ 0.90	5.70 $\pm$ 1.18	7.33 $\pm$ 1.18	5.69 $\pm$ 1.28
Air breathing Index (Total frequency) day 28	2.02 $\pm$ 0.43	4.52 $\pm$ 1.69	1.69 $\pm$ 1.49	5.48 $\pm$ 1.63	8.49 $\pm$ 1.81	6.48 $\pm$ 1.46
Agonistic behavior Index (Total frequency) day 8	1.55 $\pm$ 0.18	1.02 $\pm$ 0.23 ^a	1.62 $\pm$ 0.25 ^b	0.15 $\pm$ 0.21	0.11 $\pm$ 0.15	0.11 $\pm$ 0.15
Agonistic behavior Index (Total frequency) day 18	2.90 $\pm$ 1.03	2.43 $\pm$ 0.58	2.40 $\pm$ 0.57	0.29 $\pm$ 0.32	0.29 $\pm$ 0.31	0.44 $\pm$ 0.60
Agonistic behavior Index (Total frequency) day 28	2.69 $\pm$ 0.61	2.50 $\pm$ 0.31 ^a	1.74 $\pm$ 0.35 ^b	0.78 $\pm$ 0.84	0.67 $\pm$ 0.70	0.39 $\pm$ 0.67
Stereotypical behavior (Total frequency) day 8	0 $\pm$ 0.00 ^a	0 $\pm$ 0.00 ^a	0 $\pm$ 0.00 ^a	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00
Stereotypical behavior (Total frequency) day 18	0 $\pm$ 0.00 ^a	0 $\pm$ 0.00 ^a	0 $\pm$ 0.00 ^a	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00

Table 5. Cont.

Video and Direct Observations	Exp. A			Exp. B		
	FeDTPA-0	FeDTPA-0.75	FeDTPA-3	FeDTPA-0	FeDTPA-3	FeDTPA-12
Stereotypical behavior (Total frequency) day 28	0 ± 0.00 ^a	0 ± 0.00 ^a	0 ± 0.00 ^a	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
Skin lesions (n) day 11	n.g.	n.g.	n.g.	5 ^A	0 ^A	3 ^A
Skin lesions (n) day 21	n.g.	n.g.	n.g.	3 ^A	13 ^B	6 ^A
Skin lesions (n) day 32	n.g.	n.g.	n.g.	11 ^A	29 ^B	3 ^A
Skin lesion area (cm ²) day 11	n.g.	n.g.	n.g.	0.43 ± 0.92 ^A	0.00 ± 0.00 ^A	0.33 ± 0.66 ^A
Skin lesion area (cm ²) day 21	n.g.	n.g.	n.g.	0.30 ± 0.75 ^A	0.65 ± 0.56 ^B	0.60 ± 1.14 ^A
Skin lesion area (cm ²) day 32	n.g.	n.g.	n.g.	0.70 ± 1.06 ^A	1.55 ± 1.81 ^B	0.15 ± 0.41 ^A

Note: Day 8 was prior to the first Fe-DTPA application. The respective Fe-DTPA concentrations were adjusted from day 10 on. The skin lesions were documented during the blood sampling. The skin lesion area is given as mean of nine sampled fish per day. Data with significant differences ($p < 0.05$) have been marked with different superscripts according to Kruskal–Wallis and Dunnett T3 test or ANOVA and Tukey HSD. Lower-case superscripts compare groups per day, upper-case superscripts compare the sampling days in a single group (only in skin lesions).

Table 6. Differential blood count in Exp. B. The distribution of leucocyte types of *C. gariepinus* juveniles during the exposure to different concentrations of Fe-DTPA (means ± standard deviation, n = 3). Means in a row followed by different superscripts are significant different ($p < 0.05$), according to Welch-ANOVA, Games-Howell. Small superscripts are significances between treatment groups within a sampling event; large superscripts are significances of particular groups over the entire study period. N.g. = not given.

Cell Types (%)	Day 11 (after 24 h)			Day 21			Day 32		
	FeDTPA-0	FeDTPA-3	FeDTPA-12	FeDTPA-0	FeDTPA-3	FeDTPA-12	FeDTPA-0	FeDTPA-3	FeDTPA-12
Lymphocytes	52.28 ± 1.73 ^A	52.91 ± 2.17 ^A	48.92 ± 3.27 ^A	58.78 ± 2.48 ^a	73.63 ± 2.65 ^b	58.41 ± 10.93	65.27 ± 7.39 ^B	65.09 ± 4.50 ^B	57.60 ± 8.77 ^B
Monocytes	19.59 ± 2.84	17.22 ± 7.18	19.53 ± 2.82	20.86 ± 7.81	14.35 ± 1.49	20.32 ± 7.12	26.40 ± 6.62	23.12 ± 1.00	28.11 ± 3.52
Mature neutrophils	22.35 ± 1.12 ^{aA}	24.78 ± 7.96 ^A	26.63 ± 0.64 ^{bA}	16.90 ± 4.74	9.03 ± 2.44	17.85 ± 5.72	6.17 ± 1.39 ^B	7.53 ± 2.51 ^B	5.54 ± 1.12 ^B
Neutrophile meta-granulocyte	3.22 ± 0.53 ^A	2.56 ± 1.93 ^A	2.74 ± 0.09 ^A	0.86 ± 0.55 ^B	1.09 ± 0.63 ^B	1.22 ± 0.20 ^B	0.49 ± 0.28 ^B	0.64 ± 0.44 ^B	0.63 ± 0.49 ^B
Neutrophile meso-granulocyte	2.48 ± 0.21 ^A	2.64 ± 1.18 ^A	2.16 ± 0.96 ^A	2.39 ± 1.39	1.80 ± 1.09	2.14 ± 0.85	1.12 ± 0.34 ^B	1.81 ± 0.58 ^B	1.58 ± 0.71 ^B
Eosinophils	n.g.	n.g.	n.g.	0.19 ± 0.33	0.06 ± 0.10	n.g.	0.48 ± 0.52	1.79 ± 2.03	0.37 ± 0.37

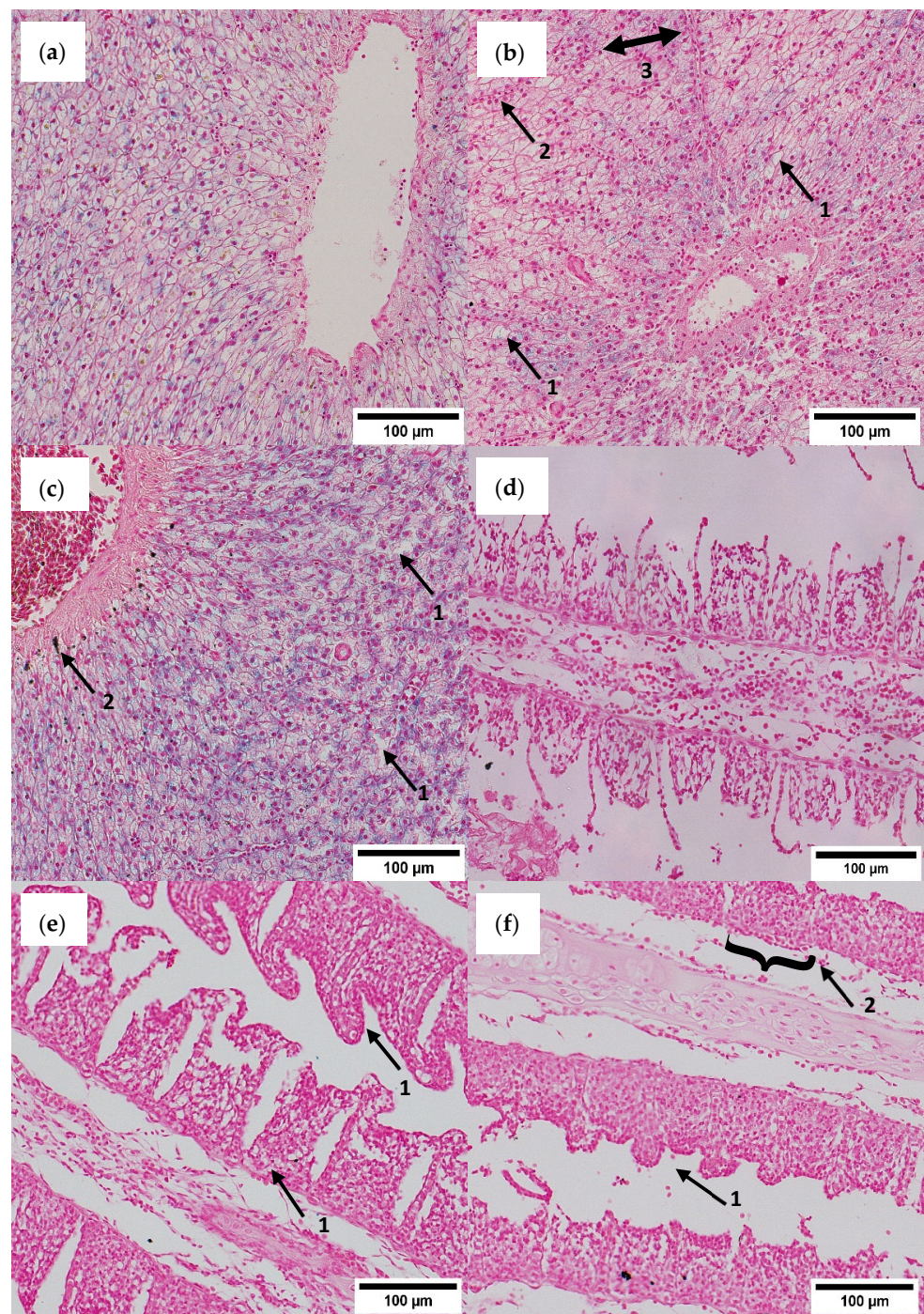


Figure 1. Histopathological evaluation of liver and gill tissue of *C. gariepinus* exposed to different Fe-DTPA concentrations in Exp. B after 32 days; (a) liver cells of the B-FeDTPA-0 group with noticeable Fe-accumulation; (b) liver cells of the B-FeDTPA-3 group with minimal Fe-accumulation near the vascular arteria and lipid droplets occurring next to hepatocytes (arrow 1), sinusoids congested with red blood cells (arrow 2), and hepatic plate (arrow 3); (c) liver cells of the B-FeDTPA-12 group with mild Fe-accumulation around vascular arteria tissue with lipid droplets (arrow 1) and gall secrets (arrow 2), central vein congested with red blood cells; (d–f) gill filaments of the B-FeDTPA-0, B-FeDTPA-3, and B-FeDTPA-12 groups without remarkable inclusions or necrosis. Hypertrophy, epithelial detachments, and secondary lamellae hyperemia of gill filaments occurred in the B-FeDTPA-3 and B-FeDTPA-12 groups (e,f) (arrows 1), and hyperplasia (arrow 2) was also detected in B-FeDTPA-12 (f). Tissues stained with Prussian blue regarding to Perls [45].

3.6. Gene Expression Profiling

We established a panel of 34 *C. gariepinus*-specific qPCR assays to assess the effects of different Fe-DTPA concentrations on the expression of various immune- and stress-related parameters in the head kidney of individuals compared to a control group without Fe-DTPA (Figure 2). We also designed assays for the reference genes *rna18s*, *rpl*, *actb*, and *gapdh*, and profiling revealed minor transcriptional alterations to varying Fe concentrations.

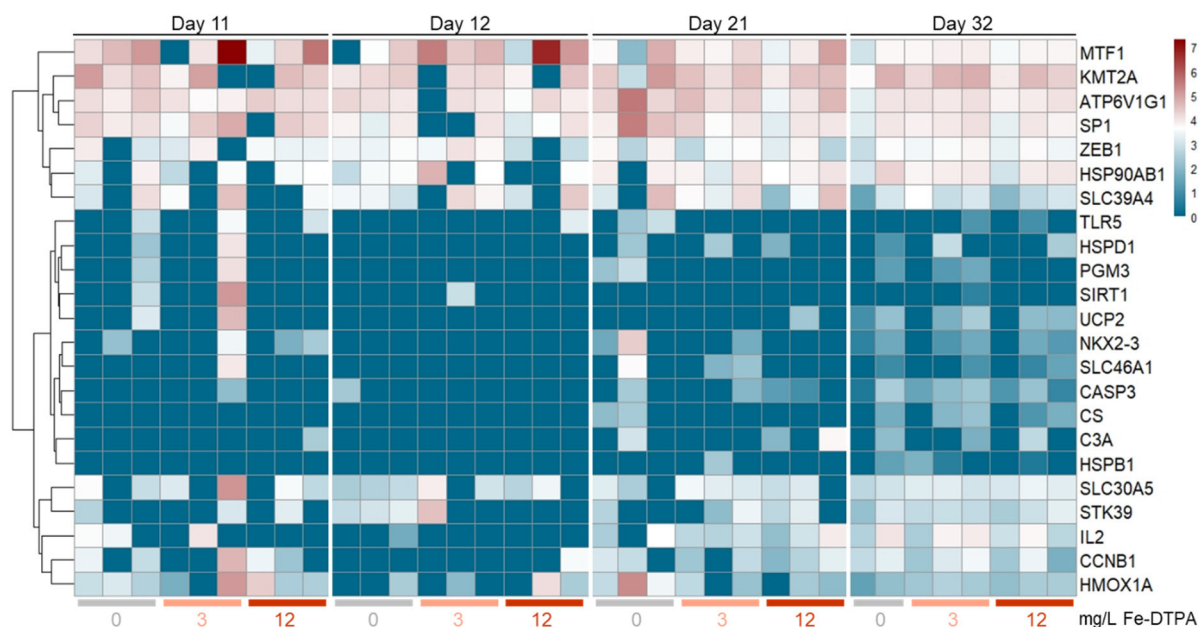


Figure 2. Hierarchical clustering of log₁₀-transformed transcript numbers measured in the head kidney of individual African catfish exposed to Fe-DTPA concentrations given below the heatmap; the sampling time points (days) are indicated above the heatmap. The transcripts quantified are listed as gene symbols on the right margin; transcript levels are colored according to the scale on the right.

Twelve of the selected target genes (*casp8*, *cp*, *hsf*, *igf1*, *il4*, *il6*, *nr3c1*, *oser1*, *osgin2*, *st8sia4*, and *tnf*) were not detectable or revealed copy numbers at negligibly low levels. The transcript levels of seven genes (*c3a*, *hspb1*, *nkx2-3*, *pgm3*, *sirt1*, *slc46a1*, and *tlr5*) remained low across all groups examined, whereas the levels of four other genes (*casp3*, *cs*, *hspb1*, and *ucp2*) increased from low to partly moderate transcript numbers after one and/or two weeks of exposure to Fe-DTPA, but not significantly. For many genes with a moderate basal expression (mostly *atp6v1g1*, *hsp90ab1*, *kmt2a*, *mtf1*, *slc39a4*, *sp1*, and *zeb1*), the transcript levels varied between individuals of one cohort, revealing not significant gene expression differences across experimental groups and time points. Altogether, the qPCR data revealed a poor, not significant response in the 23 detectable genes in *C. gariepinus* exposed to Fe.

4. Discussion

4.1. Water Quality

The African catfish tolerates a wide range of water quality parameters, i.e., a temperature between 18–32 °C, albeit the optimal temperature for development and growth ranges between 27–29 °C [46]. A pH between 5.0 and 9.0 meets the requirements for this species [46]; in aquaponics, however, the pH is usually lower (approx. 6.5–7.0) because of more efficient bacterial activity and nutrient uptake of the plants [47]. DO levels were recommended between 3–6 mg/L [46], but higher levels, up to approx. 9.0 mg/L, are also considered to be adequate [48]. EC values between 100 and approx. 2000 µS/cm has been reported to be well tolerated by the fish [48,49]. Concentrations of NO₃, NO₂, and NH₄(NH₃) had been shown to be still tolerated in ranges up to 697.5 mg/L, 0.6 mg/L, and 20.46 mg/L (>0.34 mg/L), respectively [50–53]. Oxidative regimes with a positive redox

potential between, for instance, +83.4 and +151.7 mV were recommended for bacterial activity in aquaponic systems and can be tolerated by *C. gariepinus* [54,55].

In the present study, the temperatures were between 28–29 °C, the pH was between 6.0–8.0, the DO levels ranged from 7 to 8 mg/L, EC were between approx. 500–1060 µS/cm, and redox potentials were between 122 and 190 mV; all parameters therefore fit to the optimal or an adequate range for the African catfish. In both the experiments, the redox potential decreased along with higher fertilization but remained in a positive (oxidative) condition. As the decreasing redox potential was seen to be non-linear in Exp. B, the deactivation of redox active metal ions (Fe^{2+} , Fe^{3+}) by used DTPA-chelator can be assumed to have created a buffering effect to the redox potential [56,57].

The Fe concentrations were taken constantly through a short time monitoring system on a defined level between 0.75 mg/L and 3.0 mg/L in Exp. A and 3.0 mg/L and 12.0 mg/L in Exp. B, respectively. In some cases, the treatment groups exceeded the general needs of plants in an aquaponic system (2–5 mg/L) but did not indicate a strong impact on the fish. Other monitored chemical water parameters (pH, O_2 , NH_4 , NO_2 , NO_3 , and PO_4) were not affected by Fe-DTPA concentrations or seemed to be influenced by the treatment.

4.2. Growth Performance and Mortality

First, it should be mentioned that neither of the experiments were designed for the most efficient growth performance. Both trials were conducted in aquarium systems, which only allowed a limited supply of nutrients, ensuring the system stability. As a result, the fish in all treatment groups grew by only a few grams. The partially large differences between the mean values are due to the fact that sometimes smaller, and sometimes larger fish were taken for sampling, and at the end of the experiment, only four or five fish remained for the mean value calculation. This indicates a strong heterogeneity of growth, which can occur particularly in the case of low feed distribution [58]. The mortality in African catfish fingerlings (1.15–1.63 g) have been described in a range between 4.3–20.0% [59,60], whereas for juveniles (102–288 g), the range is between 2.0–4.8% [53,61]. In the present study, it was in a similar range (between approx. 5.5% and 11.1%). No influence of the different Fe concentrations was found, since on the one hand, only jumpers died, but on the other hand, the control was in a similar range.

4.3. Physiological and Behavioral Responses

Unaffected leukocyte distributions of African catfish (with weights of approx. 320 g) were described with lymphocytes at 55.0%, monocytes at 3.2%, and neutrophils at 43.4% [62], and with lymphocytes at 69.0%, monocytes at 3.0%, neutrophils/heterophils at 25.0%, and eosinophils at 3.0% [63].

In the present study, we found a significantly lower number for all three types of neutrophilic granulocytes along with a significantly increased number of lymphocytes at the end of the experiment (after 32 days) in relation to the initial sampling (after 11 days) in all treatments. The number of monocytes also tended to increase ($p < 0.1$) over time. According to Clauss et al. [39], a lower presence of mature neutrophils in the peripheral blood, along with a slightly trend of a monocytosis, which was seen in the present study, is a hint for a starting inflammatory reaction. As the higher phagocytic activity reduces number of mature neutrophils, proliferation and formation of large numbers of new neutrophilic meso- and meta-granulocytes indicate an ongoing immune response. Higher rates of matured neutrophils indicate the remission of a previous immune response as all pathogen matter has eliminated. A potential inflammatory response in the present study was presumably a result of increased numbers of skin lesions following elevated agonistic interactions among the fish rather than a response to Fe concentrations in the water. In the present study, the cell counts of monocytes were generally higher, whereas neutrophils were lower (also without Fe-DTPA, respectively) in comparison to the reference values above. A distinct effect of the added Fe-DTPA is therefore questionable.

Van de Nieuwegiessen et al. [44] described agonistic behavior of juvenile African catfish (weighing between 10 to about 100 g) at 0–12 (lesion number/fish/h); furthermore, Van de Nieuwegiessen et al. [61] described agonistic behavior in African catfish (about 102–288 g) at 0–8. Both of these studies were under different stocking densities. The significant differences regarding the agonistic behavior in the present experiments should be interpreted with caution. All values are within the normal range and may easily have been influenced by, for example, group composition [64]. Comparing the significant data from day 8 (without Fe-DTPA) of Exp. A with the following days, this becomes even more evident.

The average number of skin lesions in African catfish was reported between 1.4–2.0 [64] or 0.8–2.4 [50]. In the present study, the number of skin lesions ranged between approx. 0.0–1.6, representing the normal range. More interesting is that in the B-FeDTPA-12 group, contrary to the development of the other two groups, the number of lesions slightly decreased. This could have resulted from a change in behavior upon the increased iron concentration but requires further investigation. Our analysis of agonistic behavior (frequency) cannot confirm this, but it also does not relate to the intensity of agonistic interactions. In any case, no negative influence on fish welfare or health was exerted by this.

4.4. Histopathology and Gene Expression Profiling

Stathopoulou et al. [1] tested Fe-DTPA (3.61 mg/L) on rocket (*Eruca vesicaria*) and Nile tilapia (*Oreochromis* spp.). Several organs showed minimal changes such as granulomas, lipid accumulation in the liver cells, and macrosteatosis of the pancreatic islets that are caused by the Fe-DTPA addition. Mild histological alterations, such as hyperplasia and telangiectasia, were found in the gills.

The histopathological results of the present study revealed changes in the liver tissue and the gills, especially under concentrations of 12.0 mg/L Fe-DTPA. The most important changes were Fe³⁺ accumulations, an incipient inclusion of lipid vacuoles in the liver, as well as hypertropia/hyperplasia of the primary lamellae, epithelial detachments, and secondary lamellae hyperemia of the gills. The recent score values of the assessed liver and gill tissue ranged from 0 (not remarkable) to 3 (moderate), slightly higher than Stathopoulou et al. [1], who used the same rating system with grades 1 (minimal) to 2 (mild) for liver and gills. According to Stathopoulou et al. [1], fat deposition in the liver is affected by the dietary lipid content but can also be a reaction to intoxication. Whether Fe-DTPA at the tested concentrations can lead to severe lipid accumulation or fatty liver need to be tested in longer-term studies. However, over a period of up to three weeks, as demonstrated in the present study, the documented alterations were not detrimental to fish health to a greater extent.

The gene expression profiling revealed no significant differences between the head kidney samples from the different treatment groups. A number of gene transcripts were undetectable with our qPCR-assay panel, but this was not an unexpected finding. Some of the selected genes are only expressed in a tissue-specific manner (*st8sia4*, for instance, is mainly present in cells of the gonads and nervous system of African catfish) and were weakly detectable in the head kidney samples in our pretests. Other genes (including *il6* and *tnf*) are known to be induced in response to acute stimuli of a given intensity [65]. Obviously, the experimental stimulus (namely the tested concentrations of Fe-DTPA) was not intense enough to provoke the induction of acute-phase and other genes measured in the present study. However, we cannot exclude that distinct genes, which were not integrated as targets in our analysis, had been modulated in their expression by Fe-DTPA exposition. Future investigations might consider holistic approaches [66,67] to identify previously unknown indicators.

5. Conclusions

Growth and mortality of African catfish were unaffected by Fe-DTPA in the tested concentrations up to 12.0 mg/L. The ethological analysis also indicated no dependency

of the behavior on Fe-DTPA treatments. Nevertheless, since minor accumulation of Fe³⁺ in liver tissue as well as histomorphological changes in gill tissue occurred in particular at 12.0 mg/L but were negligible at 3.0 mg/L, and since the fertilization recommendation of Fe in hydroponic cultures is 4.0 mg/L, we recommend a lower addition to aquaponics with African catfish. Long-term studies should continue to clarify whether there can also be a stronger influence on or damage to the animals over longer exposure.

Author Contributions: The authors of this article made the following contributions: conceptualization, M.-C.H. and B.B.; methodology, M.-C.H., B.B. and A.R.; validation, M.-C.H., B.B. and A.R.; formal analysis, M.-C.H.; investigation, M.-C.H., B.B., A.R. and J.A.N.; resources, M.-C.H. and A.R.; data curation, M.-C.H., A.R.; writing—original draft preparation, M.-C.H. and B.B.; writing—review and editing, M.-C.H., B.B., H.W.P. and A.R.; visualization, M.-C.H. and A.R.; supervision, B.B. and H.W.P.; project administration, B.B.; and funding acquisition, H.W.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the project “Performance and process water management in commercial (integrated) aquaculture systems with African catfish (*Clarias gariepinus*) in Mecklenburg-Western Pomerania” (MV-II.1-LM-007: 139030000103, EMFF: 7302).

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are not publicly available, although they are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We thank Markus Kipp and Frauke Winzer (Institute for Anatomy, University of Rostock) for histological sample preparation and assistance and Julian Krinitskij (FBN) for his assistance with the gene-expression profiling. We thank Erwin Berchtold, Leopold Hummel, Lisa Carolina Wenzel, Lu Xu, and Laura Ballesteros Redondo (Department of Aquaculture and Sea-Ranching, University of Rostock) for their assistance during samplings.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of the data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Stathopoulou, P.; Tsoumalakou, E.; Levizou, E.; Vanikiotis, T.; Zaoutsos, S.; Berillis, P. Iron and potassium fertilization improve rocket growth without affecting tilapia growth and histomorphology characteristics in aquaponics. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 5681. [\[CrossRef\]](#)
2. Sayara, T.; Amarneh, B.; Saleh, T.; Aslan, K.; Abuhanish, R.; Jawabreh, A. Hydroponic and aquaponic systems for sustainable agriculture and environment. *Int. J. Plant Sci. Ecol.* **2016**, *2*, 23–29.
3. Maneepong, S. Nutrient dynamics of an aquaponic system in Southern Thailand. *J. Agric. Sci.* **2019**, *11*, 57–65. [\[CrossRef\]](#)
4. Da Silva Cerozi, B. Fulvic acid increases iron bioavailability in aquaponic systems: Theoretical designs and practical considerations to prevent iron deficiency in plants. *Aquac. Eng.* **2020**, *90*, 102091. [\[CrossRef\]](#)
5. Bittsanszky, A.; Uzinger, N.; Gyulai, G.; Mathis, A.; Junge, R.; Villarroel, M.; Kotzen, B.; Kőmives, T. Nutrient supply of plants in aquaponic systems. *Ecocycles* **2016**, *2*, 17–20. [\[CrossRef\]](#)
6. Fernández, V.; Del Río, V.; Pumariño, L.; Igartua, E.; Abadía, J.; Abadía, A. Foliar fertilization of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) with different iron formulations: Effects on re-greening, iron concentration and mineral composition in treated and untreated leaf surfaces. *Sci. Hortic.* **2008**, *117*, 241–248. [\[CrossRef\]](#)
7. Narimani, H.; Rahimi, M.M.; Ahmadikhah, A.; Vaezi, B. Study on the effects of foliar spray of micronutrient on yield and yield components of durum wheat. *Arch. Appl. Sci. Res.* **2010**, *2*, 168–176.
8. Kasozi, N.; Tandlich, R.; Fick, M.; Kaiser, H.; Wilhelmi, B. Iron supplementation and management in aquaponic systems: A review. *Aquac. Rep.* **2019**, *15*, 100221. [\[CrossRef\]](#)
9. Yep, B.; Zheng, Y. Aquaponic trends and challenges—A review. *J. Clean. Prod.* **2019**, *228*, 1586–1599. [\[CrossRef\]](#)
10. Roosta, H.R.; Mohsenian, Y. Alleviation of Alkalinity-Induced Fe Deficiency in Eggplant (*Solanum melongena* L.) by Foliar Application of Different Fe Sources in Recirculating System. *J. Plant Nutr.* **2015**, *38*, 1768–1786. [\[CrossRef\]](#)
11. Yep, B.; Zheng, Y. Potassium and micronutrient fertilizer addition in a mock aquaponic system for drug-type *Cannabis sativa* L. cultivation. *Can. J. Plant Sci.* **2020**, *101*, 341–352. [\[CrossRef\]](#)
12. Siqwepu, O.; Salie, K.; Goosen, N. Evaluation of chelated iron and iron sulfate in the diet of African catfish, *Clarias gariepinus* to enhance iron excretion for application in integrated aquaponics systems. *J. World Aquac. Soc.* **2020**, *51*, 1034–1053. [\[CrossRef\]](#)
13. Siqwepu, O.; Salie, K.; Goosen, N. Evaluation of potassium diformate and potassium chloride in the diet of the African catfish, *Clarias gariepinus* in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture* **2020**, *526*, 735414. [\[CrossRef\]](#)

14. Shuhaimi-Othman, M.; Yakub, N.; Ramle, N.A.; Abas, A. Comparative toxicity of eight metals on freshwater fish. *Toxicol. Ind. Health* **2015**, *31*, 773–782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ajima, M.N.O.; Ogo, O.A.; Akpa, L.E.; Ajaero, I. Biochemical and haematological responses in African catfish *Clarias gariepinus* following chronic exposure to NPK (15:15:15) fertiliser. *Afr. J. Aquat. Sci.* **2015**, *40*, 73–79. [[CrossRef](#)]
16. Wenzel, L.C.; Strauch, S.M.; Eding, E.; Presas-Basalo, F.X.; Wasenitz, B.; Palm, H.W. Effects of dissolved potassium on growth performance, body composition, and welfare of juvenile african catfish (*Clarias gariepinus*). *Fishes* **2021**, *6*, 11. [[CrossRef](#)]
17. De Silva, D.M.; Askwith, C.C.; Kaplan, J. Molecular mechanisms of iron uptake in eukaryotes. *Physiol. Rev.* **1996**, *76*, 31–47. [[CrossRef](#)]
18. Aisen, P.; Enns, C.; Wessling-Resnick, M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2001**, *33*, 940–959. [[CrossRef](#)]
19. Davis, D.A.; Gatlin, D.M., III. Dietary mineral requirements of fish and marine crustaceans. *Rev. Fish. Sci.* **1996**, *4*, 75–99. [[CrossRef](#)]
20. Andersen, O. Accumulation of waterborne iron and expression of ferritin and transferrin in early developmental stages of brown trout (*Salmo trutta*). *Fish Physiol. Biochem.* **1997**, *16*, 223–231. [[CrossRef](#)]
21. Watanabe, T.; Kiron, V.; Satoh, S. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* **1997**, *151*, 185–207. [[CrossRef](#)]
22. Bury, N.R.; Grosell, M.; Wood, C.M.; Hogstrand, C.; Wilson, R.W.; Rankin, J.C.; Busk, M.; Lecklin, T.; Jensen, F.B. Intestinal iron uptake in the European flounder (*Platichthys flesus*). *J. Exp. Biol.* **2001**, *204*, 3779–3787. [[CrossRef](#)]
23. Peter, M.S.; Leji, J.; Rejitha, V.; Ignatius, J.; Peter, V.S. Physiological responses of African catfish (*Clarias gariepinus*) to water-borne ferric iron: Effects on thyroidal, metabolic and hydromineral regulations. *J. Endocrinol. Reprod.* **2008**, *12*, 24–30.
24. Cooper, C.A.; Bury, N.R. The gills as an important uptake route for the essential nutrient iron in freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish Biol.* **2007**, *71*, 115–128. [[CrossRef](#)]
25. Peter MC, S.; Rejitha, V.; Dilip, D.G. Handling of ferric iron by branchial and intestinal epithelia of climbing perch (*Anabas testudineus* Bloch). *Indian J. Exp. Biol.* **2007**, *45*, 896–900.
26. Baker RT, M.; Martin, P.; Davies, S.J. Ingestion of sub-lethal levels of iron sulphate by African catfish affects growth and tissue lipid peroxidation. *Aquat. Toxicol.* **1997**, *40*, 51–61. [[CrossRef](#)]
27. Rakocy, J.E. Aquaponics: Integrating fish and plant culture. *Aquac. Prod. Syst.* **2012**, *1*, 343–386. [[CrossRef](#)]
28. Rose, A.L.; Waite, T.D. Kinetic model for Fe (II) oxidation in seawater in the absence and presence of natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 433–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Bartelme, R.P.; Oyserman, B.O.; Blom, J.E.; Sepulveda-Villet, O.J.; Newton, R.J. Stripping away the soil: Plant growth promoting microbiology opportunities in aquaponics. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–7. [[CrossRef](#)]
30. Radzki, W.; Gutierrez Mañero, F.J.; Algar, E.; Lucas García, J.A.; García-Villaraco, A.; Ramos Solano, B. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2013**, *104*, 321–330. [[CrossRef](#)]
31. Goddek, S.; Delaide, B.; Mankasingh, U.; Ragnarsdottir, K.V.; Jijakli, H.; Thorarinsdottir, R. Challenges of sustainable and commercial aquaponics. *Sustainability* **2015**, *7*, 4199–4224. [[CrossRef](#)]
32. Anderson, T.S.; De Villiers, D.; Timmons, M.B. Growth and tissue elemental composition response of butterhead lettuce (*Lactuca sativa*, cv. Flandria) to hydroponic and aquaponic conditions. *Horticulturae* **2017**, *3*, 43. [[CrossRef](#)]
33. Strauch, S.M.; Wenzel, L.C.; Bischoff, A.; Dellwig, O.; Klein, J.; Schüch, A.; Wasenitz, B.; Palm, H.W. Commercial African catfish (*Clarias gariepinus*) recirculating aquaculture systems: Assessment of element and energy pathways with special focus on the phosphorus cycle. *Sustainability* **2018**, *10*, 1805. [[CrossRef](#)]
34. Latimer, J.G. The Basics of Fertilizer Calculations for Greenhouse Crops. *VCE Publ.* **2015**, 430.
35. Ricker, W.E. Linear regressions in fishery research. *J. Fish. Board Can.* **1973**, *30*, 409–434. [[CrossRef](#)]
36. Mulisch, M. Präparation für die konventionelle Rasterelektronenmikroskopie (REM). In *Romeis-Mikroskopische Technik*; Springer Spektrum: Berlin, Heidelberg, 2015; pp. 145–152.
37. Rümke, C.L.; Klein, Z. Statistische Betrachtungen über die Genauigkeit der Differenzierung und der Zählung von Leukozyten. *Z. Klin. Med.* **1987**, *42*, 173.
38. Ainsworth, A.J. Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. *Annu. Rev. Fish Dis.* **1992**, *2*, 123–148. [[CrossRef](#)]
39. Clauss, T.M.; Dove, A.D.; Arnold, J.E. Hematologic disorders of fish. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* **2008**, *11*, 445–462. [[CrossRef](#)]
40. Boomker, J.D. The haematology and histology of the haemopoietic organs of South African freshwater fish. III. The leucocytes, plasma cells and macrophages of *Clarias gariepinus* and *Sarotherodon mossambicus*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **1981**, *48*, 185–193.
41. Johnson, R.; Wolf, J.; Braunbeck, T. *OECD Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads*; OECD: Paris, France, 2009; p. 96.
42. Chapman, J.R.; Waldenström, J. With reference-to-reference genes: A systematic review of endogenous controls in gene expression studies. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0141853. [[CrossRef](#)]
43. Swirplies, F.; Wuertz, S.; Baßmann, B.; Orban, A.; Schäfer, N.; Brunner, R.M.; Hadlich, F.; Goldammer, T.; Rebl, A. Identification of molecular stress indicators in pikeperch *Sander lucioperca* correlating with rising water temperatures. *Aquaculture* **2019**, *501*, 260–271. [[CrossRef](#)]

44. Van de Nieuwegiessen, P.G.; Boerlage, A.S.; Verreth, J.A.; Schrama, J.W. Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2008**, *115*, 233–243. [\[CrossRef\]](#)
45. Perls, M. Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten. *Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* **1867**, *39*, 42–48. [\[CrossRef\]](#)
46. Păpuc, T.; Petrescu-Mag, I.V.; Gavriloaie, C.; Botha, M.; Kovacs, E.; Coroian, C.O. Swimming in the mud—a short review of environmental parameter ranges tolerated by *Clarias gariepinus*. *Extrem. Life Biospeology Astrobiol.* **2019**, *11*, 9–17.
47. Tyson, R.V.; Simonne, E.H.; White, J.M.; Lamb, E.M. Reconciling water quality parameters impacting nitrification in aquaponics: The pH levels. In Proceedings of the Florida State Horticultural Society, Sanford, FL, USA, 6–8 June 2004; Volume 117, pp. 79–83.
48. Baßmann, B.; Harbach, H.; Weißbach, S.; Palm, H.W. Effect of plant density in coupled aquaponics on the welfare status of African catfish, *Clarias gariepinus*. *J. World Aquac. Soc.* **2020**, *51*, 183–199. [\[CrossRef\]](#)
49. Hanika, S.; Kramer, B. Electrosensory prey detection in the African sharp-tooth catfish, *Clarias gariepinus* (Clariidae), of a weakly electric mormyrid fish, the bulldog (Marcusenius macrolepidotus). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2000**, *48*, 218–228. [\[CrossRef\]](#)
50. Baßmann, B.; Brenner, M.; Palm, H.W. Stress and welfare of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) in a coupled aquaponic system. *Water* **2017**, *9*, 504. [\[CrossRef\]](#)
51. Schram, E.; Roques, J.A.; Abbink, W.; Spanings, T.; De Vries, P.; Bierman, S.; van de Vis, H.; Flik, G. The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* **2010**, *306*, 108–115. [\[CrossRef\]](#)
52. Schram, E.; Roques, J.A.; Abbink, W.; Yokohama, Y.; Spanings, T.; de Vries, P.; Bierman, S.; van de Vis, H.; Flik, G. The impact of elevated water nitrate concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquac. Res.* **2014**, *45*, 1499–1511. [\[CrossRef\]](#)
53. Knaus, U.; Wenzel, L.C.; Appelbaum, S.; Palm, H.W. Aquaponics (sl) Production of spearmint (*Mentha spicata*) with African catfish (*Clarias gariepinus*) in Northern Germany. *Sustainability* **2020**, *12*, 8717. [\[CrossRef\]](#)
54. Knaus, U.; Palm, H.W. Effects of the fish species choice on vegetables in aquaponics under spring-summer conditions in northern Germany (Mecklenburg Western Pomerania). *Aquaculture* **2017**, *473*, 62–73. [\[CrossRef\]](#)
55. Homoki, D.; Minya, D.; Kovács, L.; Molnár, Á.; Balogh, K.; Bársony, P.; Fehér, M.; Kövics, G.; Stündl, L. Comparison of the technological background of aquaponic systems. *Acta Agrar. Debr.* **2020**, *1*, 47–52. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Cohen, G.; Lewis, D.; Sinet, P.M. Oxygen consumption during the fenton-type reaction between hydrogen peroxide and a ferrous-chelate (Fe²⁺-DTPA). *J. Inorg. Biochem.* **1981**, *15*, 143–151. [\[CrossRef\]](#)
57. Fisher, A.E.; Maxwell, S.C.; Naughton, D.P. Superoxide and hydrogen peroxide suppression by metal ions and their EDTA complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *316*, 48–51. [\[CrossRef\]](#)
58. Martins, C.I.; Aanyu, M.; Schrama, J.W.; Verreth, J.A. Size distribution in African catfish (*Clarias gariepinus*) affects feeding behaviour but not growth. *Aquaculture* **2005**, *250*, 300–307. [\[CrossRef\]](#)
59. Adewolu, M.A.; Adeniji, C.A.; Adejobi, A.B. Feed utilization, growth and survival of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) fingerlings cultured under different photoperiods. *Aquaculture* **2008**, *283*, 64–67. [\[CrossRef\]](#)
60. Marimuthu, K.; Umah, R.; Muralikrishnan, S.; Xavier, R.; Kathiresan, S. Effect of different feed application rate on growth, survival and cannibalism of african catfish, *Clarias gariepinus* fingerlings. *Emir. J. Food Agric.* **2011**, *23*, 330–337.
61. Van de Nieuwegiessen, P.G.; Olwo, J.; Khong, S.; Verreth, J.A.; Schrama, J.W. Effects of age and stocking density on the welfare of African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. *Aquaculture* **2009**, *288*, 69–75. [\[CrossRef\]](#)
62. Gabriel, U.U.; Ezeri GN, O.; Opabunmi, O.O. Influence of sex, source, health status and acclimation on the haematology of *Clarias gariepinus* (Burch, 1822). *Afr. J. Biotechnol.* **2004**, *3*, 463–467. [\[CrossRef\]](#)
63. Bello, O.S.; Olaifa, F.E.; Emikpe, B.O. Haematological and blood biochemical changes in African catfish, *Clarias gariepinus* fed walnut (*Tetracarpidium conophorum* Mull Arg) leaf and onion (*Allium cepa* Linn) bulb supplemented diets. *Am. J. Exp. Agric.* **2014**, *4*, 1593. [\[CrossRef\]](#)
64. Martins, C.I.; Schrama, J.W.; Verreth, J.A. The effect of group composition on the welfare of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2006**, *97*, 323–334. [\[CrossRef\]](#)
65. Tort, L. Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* **2011**, *35*, 1366–1375. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Oomen, R.A.; Hutchings, J.A. Transcriptomic responses to environmental change in fishes: Insights from RNA sequencing. *Facets* **2017**, *2*, 610–641. [\[CrossRef\]](#)
67. Chan, J.T.; Kadri, S.; Köllner, B.; Rebl, A.; Korytář, T. RNA-Seq of Single Fish Cells—Seeking Out the Leukocytes Mediating Immunity in Teleost Fishes. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 798712. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

7. Publikationsliste und Beschreibung des Beitrags

Baßmann, B., Hahn, L., Rebl, A., Wenzel, L. C., Hildebrand, M.-C., Verleih, M., & Palm, H. W. (2023). Effects of stocking density, size, and external stress on growth and welfare of African catfish (Clarias gariepinus Burchell, 1822) in a commercial RAS. Fishes, 8(2), 74.

Publikation: Baßmann et al. (2023), Doi: doi.org/10.3390/fishes8020074

B. Baßmann: Konzeptentwicklung, Methodik, Untersuchungen, Datenaufnahme & -analyse, Schreiben des Originalentwurfs, Visualisierungen, Editieren & Einreichen, Ressourcen und Projektverwaltung.

L. Hahn: Untersuchungen und Datenaufnahme & -analyse.

A. Rebl: Untersuchungen, Datenaufnahme & -analyse, Visualisierungen und Editieren & Einreichen.

L. C. Wenzel: Konzeptentwicklung, Untersuchungen, Editieren & Einreichen und Ressourcen.

M.-C. Hildebrand: Untersuchungen, Datenaufnahme & -analyse und Editieren & Einreichen.

M. Verleih: Untersuchungen, Datenaufnahme & -analyse und Editieren & Einreichen.

H. W. Palm: Editieren & Einreichen, Betreuung und Fördermittelakquise.

Hildebrand, M.-C., Runge, D., Bassmann, B., & Palm, H. W. (2025). The Influence of Different Feeding Time Management on the Growth and Stress Response of the African Catfish Clarias gariepinus (Burchell, 1822) Under Farming Conditions. Fishes, 10(8), 414.

Publikation: Hildebrand et al. (2025), Doi: doi.org/10.3390/fishes10080414

M.-C. Hildebrand: Datenaufnahme & -analyse, Schreiben des Originalentwurfs,

Visualisierungen und Editieren & Einreichen.

D. Runge: Methodik, Untersuchungen und Datenaufnahme & -analyse.

B. Baßmann: Konzeptentwicklung, Methodik, Untersuchungen und Ressourcen.

H. W. Palm: Betreuung, Projektverwaltung und Fördermittelakquise.

Hildebrand, M.-C., Hentrich, N., & Palm, H. W. (2024). The role of light in the rearing of Clarias gariepinus larvae: Effects on behavior, growth and survival. Aquaculture Reports, 39, 102420.

Publikation: Hildebrand et al. (2024a), Doi: doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102420

M.-C. Hildebrand: Konzeptentwicklung, Methodik, Untersuchungen, Datenaufnahme & -analyse, Schreiben des Originalentwurfs, Visualisierungen, Editieren & Einreichen und Ressourcen.

N. Hentrich: Untersuchungen und Datenaufnahme & -analyse.

H. W. Palm: Editieren & Einreichen, Betreuung, Projektverwaltung und Fördermittelakquise.

*Hildebrand, M-C., Rebl, A., Goldammer, T., Palm, H. W., & Baßmann, B. (2024). Effects of Zn-EDTA on the health and welfare of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), in a recirculating aquaculture system. *Frontiers in Aquaculture*, 3, 1383534.*

Publikation: Hildebrand et al. (2024b), Doi: doi.org/10.3389/faqc.2024.1383534

M-C. Hildebrand: Konzeptentwicklung, Methodik, Untersuchungen, Datenaufnahme & -analyse, Schreiben des Originalentwurfs, Visualisierungen, Editieren & Einreichen und Ressourcen.

A. Rebl: Methodik, Untersuchungen, Schreiben des Originalentwurfs, Visualisierungen, Editieren & Einreichen und Ressourcen.

T. Goldammer: Untersuchungen und Schreiben des Originalentwurfs.

H. W. Palm: Editieren & Einreichen, Betreuung und Fördermittelakquise.

B. Baßmann: Konzeptentwicklung, Methodik, Untersuchungen, Schreiben des Originalentwurfs, Editieren & Einreichen, Betreuung und Projektverwaltung.

*Hildebrand, M-C., Rebl, A., Nguinkal, J. A., Palm, H. W., & Baßmann, B. (2023). Effects of Fe-DTPA on health and welfare of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Water*, 15(2), 299.*

Publikation: Hildebrand et al. (2023), Doi: doi.org/10.3390/w15020299

M-C. Hildebrand: Konzeptentwicklung, Methodik, Untersuchungen, Datenaufnahme & -analyse, Schreiben des Originalentwurfs, Visualisierungen, Editieren & Einreichen und Ressourcen.

B. Baßmann: Konzeptentwicklung, Methodik, Datenaufnahme & -analyse, Schreiben des Originalentwurfs, Editieren & Einreichen, Betreuung und Projektverwaltung.

A. Rebl: Methodik, Untersuchungen, Datenaufnahme & -analyse, Schreiben des Originalentwurfs, Visualisierungen, Editieren & Einreichen und Ressourcen.

J. A. Nguinkal: Untersuchungen.

H. W. Palm: Editieren & Einreichen, Betreuung und Fördermittelakquise.

8. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema:

*„Einflüsse des Managements und äußerer Haltungsbedingungen auf den Afrikanischen Raubwels *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) in Kreislaufanlagen (RAS)“*

selbstständig verfasst und nicht bereits als Dissertation verwendet habe sowie die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Ich erkläre zudem, dass weder Textabschnitte noch Abbildungen (Tabellen & Grafiken) von Dritten übernommen wurden, sofern dies nicht ausdrücklich gekennzeichnet wurde.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Rostock den

Marc-Christopher Hildebrand

9. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Arbeit an diesem Thema unterstützt haben. Vor allem möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Harry W. Palm, für die Vermittlung und die Möglichkeit danken, in so einem interessanten Feld promovieren zu dürfen. Außerdem dafür, dass seine Tür immer offenstand und er mit seiner verständnisvollen Art und seiner steten Unterstützung meine Arbeiten über den gesamten Arbeitsprozess hinweg begleitete.

Vielen Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Physiologie der Universität Rostock. Hierbei sind vor allem Frau Frauke Winzer (MTA) und Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp zu nennen, die mir die Nutzung Ihrer Laboratorien ermöglichten und durch ihre fundierten Kenntnisse in der Methodik eines Präparationslabors meine praktischen Fähigkeiten bereicherten.

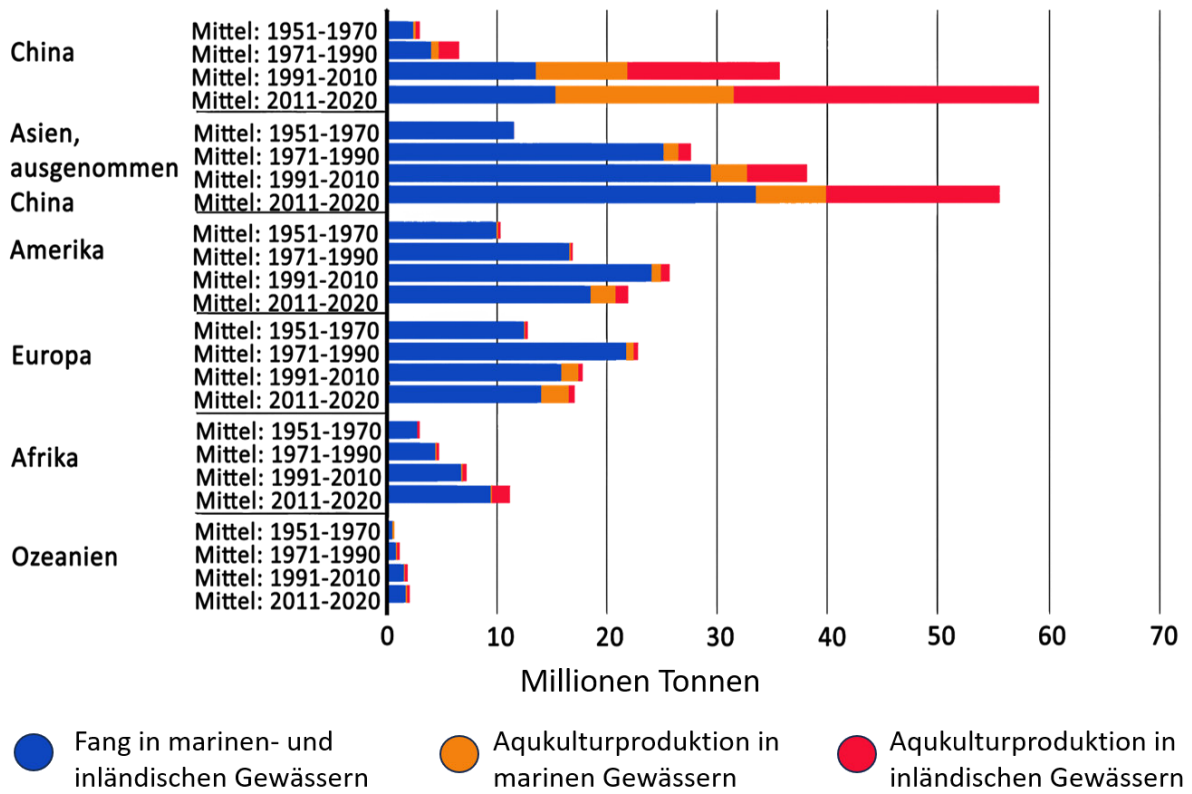
Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Björn Baßmann aus dem Fachbereich Aquakultur der Universität Rostock danken. Seine Hilfe bei der Durchführung von Experimenten und bei der Hilfe von Korrekturen hat meine Fähigkeiten bereichert und er war mir immer ein guter Ratgeber bei schwierigen Entscheidungen.

Insbesondere möchte ich den Mitarbeitern des Forschungsinstituts für Nutztierbiologie (FBN) aus der Abteilung Fischgenetik danken, die mich bei der Herstellung von genetischen Primern, die in dieser Studie zum Einsatz kamen, unterstützt haben. Besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Dr. rer. nat. Alexander Rebl für seine ausdauernde Unterstützung beim Korrigieren der schriftlichen Fassungen der Artikel und dafür, dass er mich immer wieder motivierte, weiterzumachen.

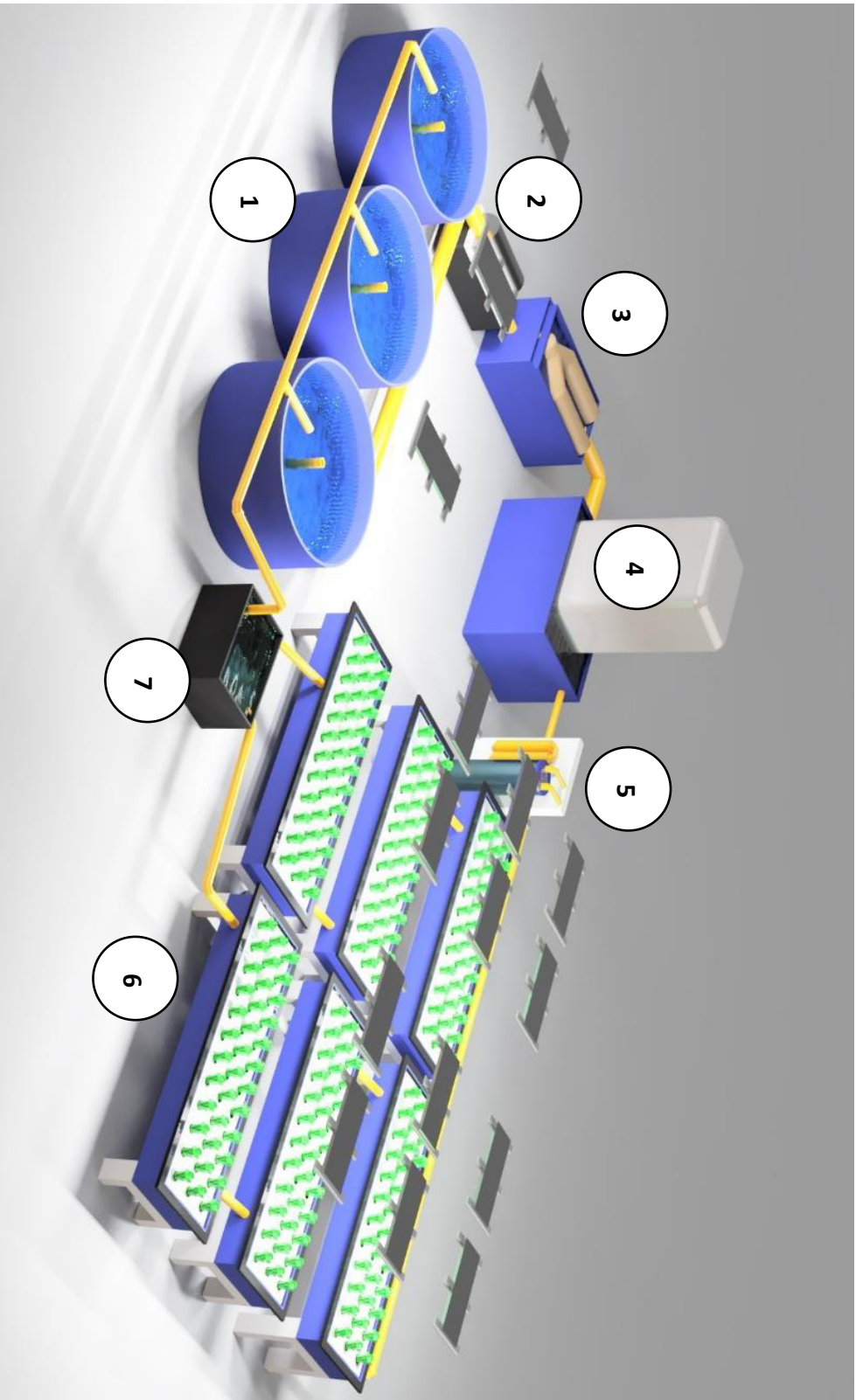
Zuletzt möchte ich mich noch bei allen Personen bedanken, die bei den aufwendigen Probenahmen mitgeholfen haben und diese Arbeit somit möglich machten. Vielen Dank!

10. Anhang

10.1 Abbildungen



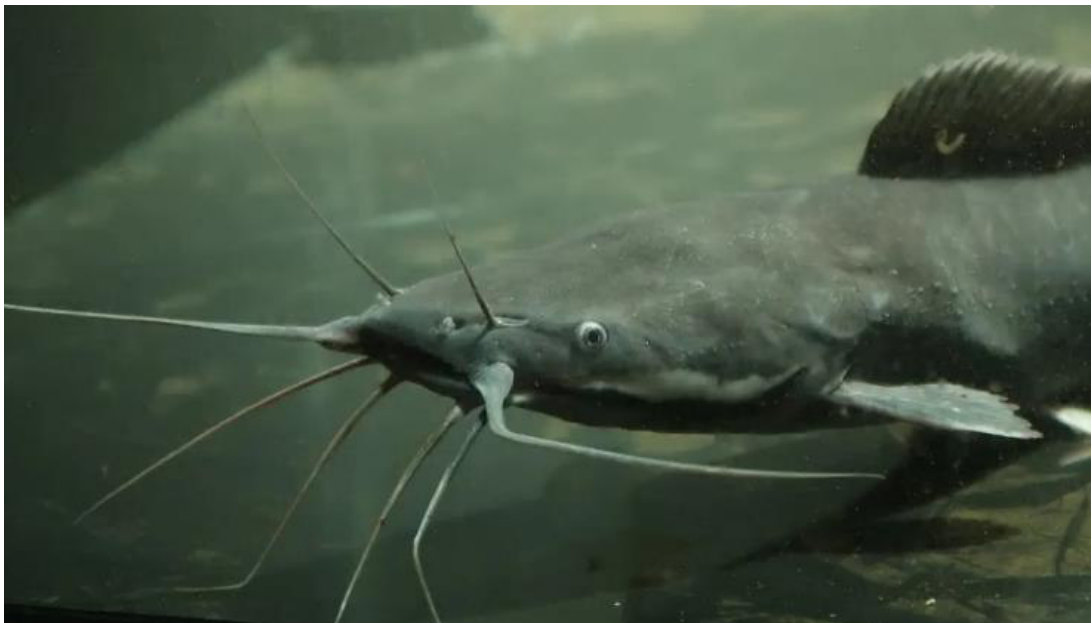
Anhang 10.1.1: Globale Aquakulturproduktion führender Produktionsgebiete aus dem Jahr 2020 in Mio. t. Entwicklung und Leistung. Aus FAO (2022, S.9).



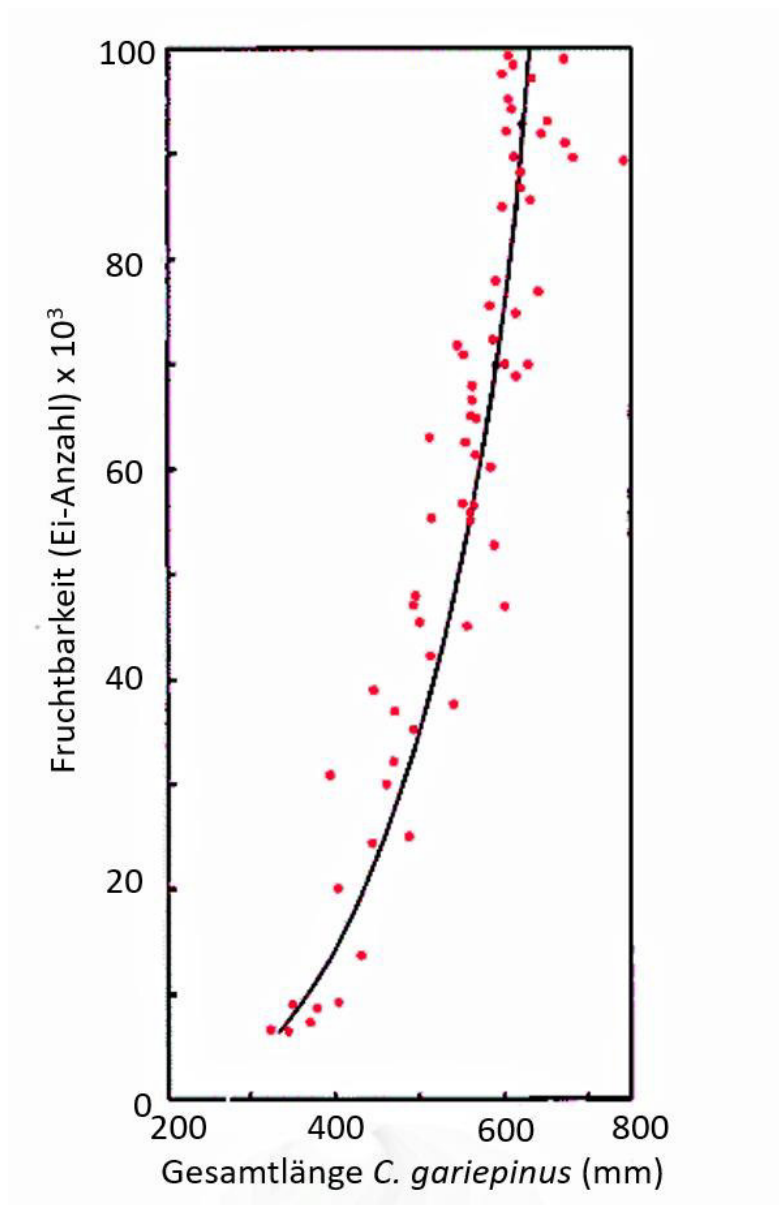
Anhang 10.1.2: Konzept einer RAS-Aquaponikanlage. 1: Haltungsbecken mit Fisch, 2: Grobfiltersystem, 3: Sedimenter, 4: Biologische Filtereinheit (Tricklingfilter), 5: UV-/O₃-Einheit, 6: Kulturpflanzeinheit, 7: Pumpensumpf.



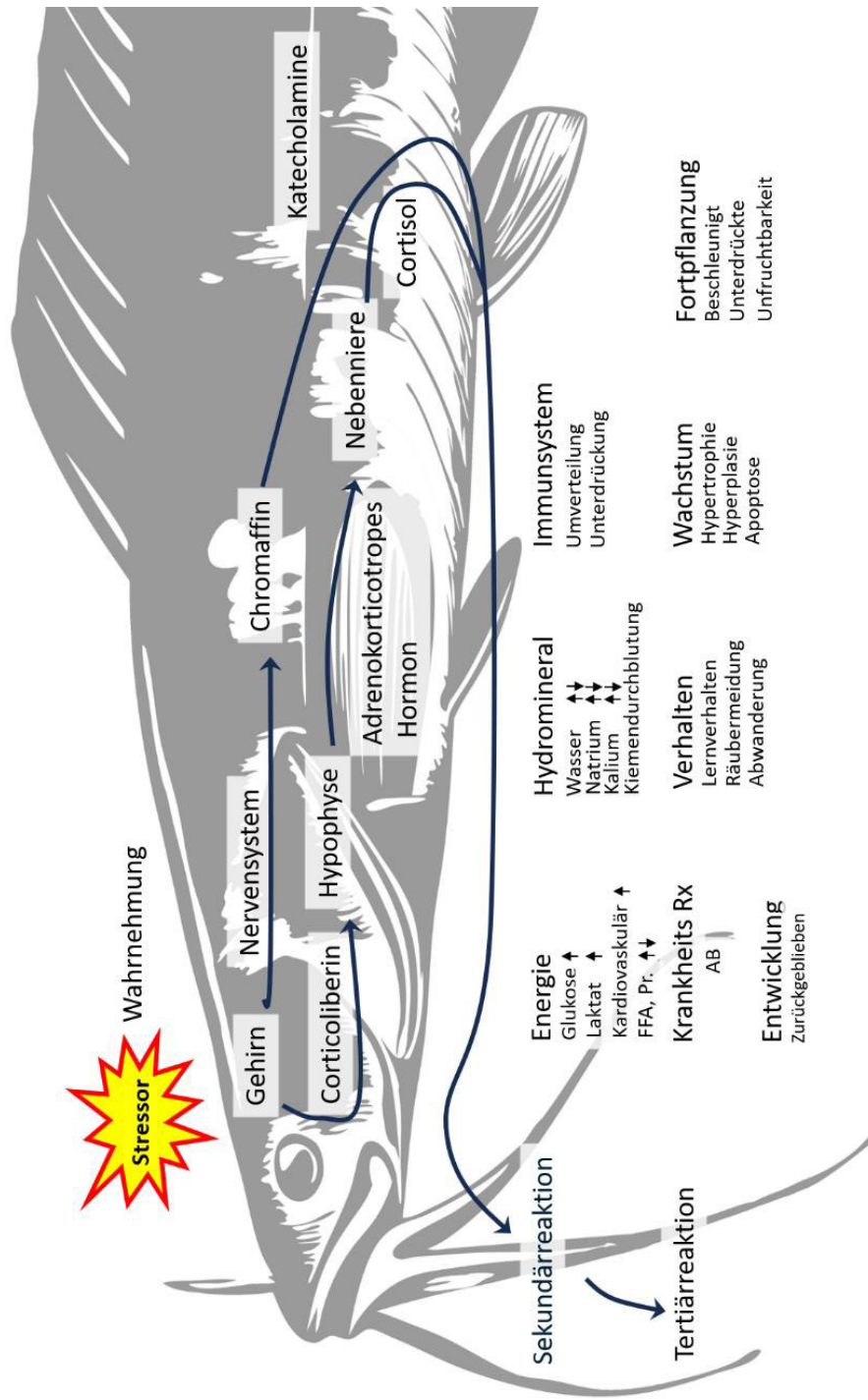
Anhang 10.1.3: Foto eines Afr. Raubwelses (*Clarias gariepinus*) in einer RAS-Aquakulturanlage.



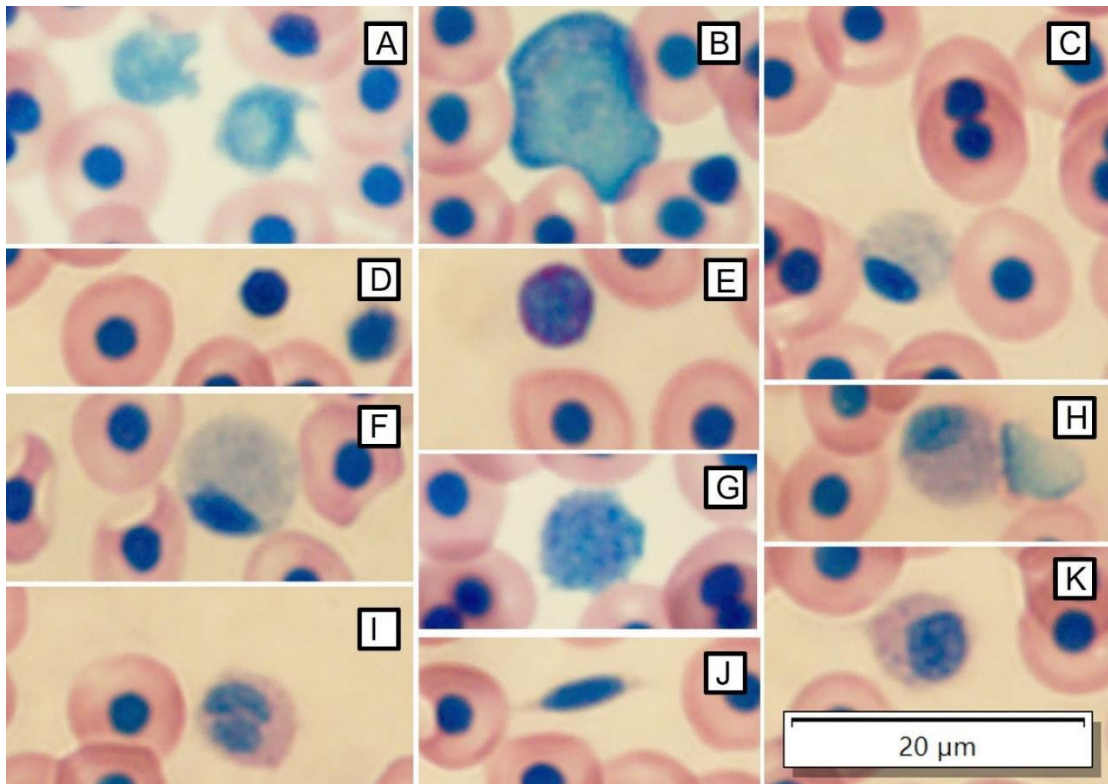
Anhang 10.1.4: Foto eines Afr. Raubwelses (*Clarias gariepinus*) in einer RAS-Aquakulturanlage.



Anhang 10.1.5: Fruchtbarkeitskorrelation eines weiblichen Afr. Raubwelses nach Bruton (1979a, S. 13). Ei-Zahlen eines Weibchens abhängig von der Fischlänge in mm auf einer 10^3 -Skala. Nicht abgebildeter Extremwert von 163.000 Eiern bei 894 mm Länge.



Anhang 10.1.6: Stressantwort bei Fischen. Die HPA-Achse modifiziert nach Schreck & Tort (2016, S. 6). Primäre (im Inneren des Fisches), sekundäre und tertiäre Reaktionen von Fischen unter Disstress. CRH: Corticotropin-Releasing-Hormon, ACTH: Adrenocorticotropes Hormon, FFA: Freie Fettsäuren, Pr: Proteine, AB: Antikörper, Rx: Resistenz.



Anhang 10.1.7: Leukozyten von *Clarias gariepinus* der Zn-EDTA und Fe-DTPA Studie in HE-Färbung unter 500x Vergrößerung (Mikroskop). A: Monozyten, B: Makrophage, C: Neutrophiler Granulozyt zwischen Erythrozyten, D: Lymphozyten, E: Basophiler Leukozyt, F: Neutrophiler Granulozyt (Heterophile), G: Mastzelle, H: Eosinophiler Leukozyt, I: Segmentierter Neutrophiler Granulozyt, J: Thrombozyt, K: Eosinophiler Leukozyt.

10.2 Tabellen

Anhang 10.2.1: Konzentrationen von gelösten Nähr- und Schadstoffen (Chemischer Elemente und Verbindungen) im Prozesswasser von *C. gariepinus*-Kreislaufaquakulturen (RAS) unter drei verschiedenen Besatzdichten unter 50% bzw. 80% Fütterung aus Strauch et al. (2018).

Nährstoffe	Konz.	Besatzdichten bei 50% Fütterung			Besatzdichten bei 80% Fütterung		
		50 kg/m ³	100 kg/m ³	200 kg/m ³	50 kg/m ³	100 kg/m ³	200 kg/m ³
NH ₄ ⁺ -N	mg/L	5,5	9,4	42,4	10,1	21,4	16,9
NO ₂ ⁻ -N	mg/L	0,09	0,16	0,46	0,12	0,51	0,02
NO ₃ ⁻ -N	mg/L	82,2	98,9	114,1	79,8	88,4	73,5
PO ₄ ²⁻ -N	mg/L	13,6	23,2	31,4	17,1	20,6	24,4
N	mg/L	87,8	108,0	157,0	90,1	110,0	90,34
P	mg/L	17,4	29,3	40,5	22,4	31,6	38,6
K	mg/L	30,3	53,0	59,7	25,56	53,5	60,1
Ca	mg/L	145,0	187,0	162,5	125,0	145,0	120,0
Mg	mg/L	19,6	27,8	26,7	17,4	25,1	23,0
S	mg/L	56,0	75,4	69,3	48,8	67,3	64,2
Na	mg/L	49,8	66,2	70,0	58,9	69,8	70,0
Fe	µg/L	50,7	58,9	417	88,3	75,3	110,0
Mn	µg/L	217,0	444,0	452,0	211,0	241,0	195,0
Mo	µg/L	2,5	3,2	3,4	2,0	3,8	4,3
Cu	µg/L	27,5	28,2	42,1	14,6	24,4	20,6
Zn	µg/L	126,0	216,0	554,0	441,0	334,0	413,0
Se	µg/L	0,43	0,7	1,2	0,55	0,93	1,3
Co	µg/L	2,8	4,3	2,6	2,3	2,4	1,8
Cr	µg/L	0,36	0,61	0,74	0,4	0,57	0,71
Schadstoffe							
As	µg/L	3,7	7,0	8,0	3,9	6,2	8,9
Cd	µg/L	0,05	0,08	0,34	0,13	0,15	0,25
Ni	µg/L	1,3	2,5	3,2	1,9	4,0	3,7
Pb	µg/L	0,09	0,16	0,42	0,1	0,33	0,27
U	µg/L	0,04	0,05	0,04	0,02	0,02	0,11

Anhang 10.2.2a: Pflanzennährstoffe für Paprika (*Capsicum annuum* L.) und ihre Funktionen und Symptome während der Nährstoffversorgung nach Calpas (2002) und Salisbury & Ross (1978) aus H. Sobi, (2012).

Element	Symbol	Typ	Verfügbarkeit für Pflanzen	Funktionen	Symptome bei Defizit
Stickstoff	N	Makronährstoff	NO_3^- , NH_4^+	Proteinsynthese, Wachstum und Ertrag	Pflanze hellgrün, untere (ältere) Blätter gelb
Phosphor	P	Makronährstoff	H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}	Zellteilung und Bildung von energetischen Strukturen	Pflanze dunkelgrün, violett werdend
Kalium	K	Makronährstoff	K^+	Zuckertransport, Steuerung der Spaltöffnungssteuerung, Kofaktor zahlreicher Enzyme, verringert die Anfälligkeit für Pflanzenkrankheiten und a-biotischen Stress, wirkt dem Salzgehalt entgegen	Gelblich grüne Ränder an älteren Blättern
Magnesium	Mg	Makronährstoff	Mg^{2+}	Zentraler Teil des Chlorophyllmoleküls	Chlorose zwischen den Adern auf älteren Blättern, die sich in nekrotische Flecken verwandelt, die zunächst fleckig aussehen
Calcium	C	Makronährstoff	Ca^{2+}	Ein wichtiger Baustein der Zellwände, der die Anfälligkeit für Krankheiten verringert	Junge Blätter der Endblüte, die sich an den Spitzen und Rändern zurückbilden, Blütenendrot der Früchte (Tomate und Paprika)
Schwefel	S	Makronährstoff	SO_4^{2-}	Synthese der essentiellen Aminosäuren Cystein und Methionin	Blätter von hellgrüner Farbe
Eisen	Fe	Mikronährstoff	Fe^{2+} , Fe^{3+}	Chlorophyll-Synthese	Vergilbung zwischen den Adern auf jungen Blättern (Interveinale Chlorose), netzartige Struktur
Mangan	Mn	Mikronährstoff	Mn^{2+}	Notwendig für den Prozess der Photosynthese	Interveinale Chlorose, netzartiges Muster

Anhang 10.2.2b: Pflanzennährstoffe für Paprika (*Capsicum annuum* L.) und ihre Funktionen und Symptome während der Nährstoffversorgung nach Calpas (2002) und Salisbury & Ross (1978) aus H. Sabi, (2012).

Element	Symbol	Typ	Verfügbarkeit für Pflanzen	Funktionen	Symptome bei Defizit
Bor	B	Mikronährstoff	H ₃ BO ₄	Bildung der Zellwand, Keimung und Streckung des Pollenschlauchs, beteiligt sich am Stoffwechsel und Transport von Zuckern	Die Blätter der Endknospe werden an der Basis hellgrün und sterben sogar ab, Pflanzen werden „brüchig“
Kupfer	Cu	Mikronährstoff	Cu ²⁺	Einflüsse auf den Stoffwechsel von Stickstoff und Kohlenhydraten	Junge Blätter fallen ab, verwelktes Aussehen
Zink	Zn	Mikronährstoff	Zn ²⁺	Synthese von Auxinen	Interveinale Chlorose bei älteren Blättern
Molybdän	Mo	Mikronährstoff	MnO ⁴⁻	Bestandteil der Enzyme Nitrat-Reduktase und Nitrogenase	Untere Blätter blass, mit verbranntem Aussehen

Anhang 10.2.3a: Liste erstellter Primer der untersuchten Referenz- und Zielgene bei *Clarias gariepinus* aus Hildebrand et al. (2023) und Hildebrand et al. (2024b).

Gen-Symbol	Gen-Produkt	Funktion	Forward Primer (3'→5'), Reverse Primer (5'→3')	Quelle (Spezies; Archivnummer)	Amplikon Länge (bp)
Referenz-Gene:					
<i>rna18s</i>	18S ribosomale RNA	Struktur der eukaryotischen Ribosomen	CTCTGCTGGACGATGGCTTAC, TCGATGAAGAACGGCAGCCAGC	<i>C. gariepinus</i> ; GQ465239	94
<i>actb</i>	Aktin-beta	Zellstruktur und -motilität, interzelluläre Signalübertragung	ACCACCCACAGCCGAGAGAGAA, CTTCAGCCCATCTTTCCTTGGT	<i>C. gariepinus</i> ; EU527191	204
<i>gapdh</i>	Glyceraldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	Kohlenhydrat-Stoffwechsel	TATGAAGCCCGCTGAGATCCG, GCCCTCTCACTTGCGAGGGT	<i>C. gariepinus</i> ; AF323693	106
<i>rpl</i>	Ribosomales Protein, große Untereinheit	Struktur der eukaryotischen Ribosomen	ACTAAATAGCAACTGATCCCTATC, GAATAITCTGACCACCTAAGATCCG	<i>C. gariepinus</i> ; MW080924	134
Ziel-Gene:					
<i>atp6v1g1</i>	ATPase H ⁺ transportierende v1 Untereinheit g1	Interzelluläre Fe-Homöostase	CGGAAAAACCGCCGCTTGAAG, GACCAAGGAAAGCCGGGCAC	<i>P. hypophthalmus</i> ; XM_026922532	106
<i>c3a</i>	Komplementkomponente 3, Variante a	Opsonisierung und Zerstörung von Bakterien	ATGTCCTTCGATGTCACGGTTAT, TCGAACCAAGAGTAACGGCATG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017457024	114
<i>casps3</i>	Caspase 3	Apoptose	CTCTTTATCATTACGGCCTTGTG, GTACTTACTGCTCCAGGTTATT	<i>I. punctatus</i> ; XM_017473312	139
<i>casps8</i>	Caspase 8	Apoptose	GTTATCAGCCGGAAGCCGCTCA, ATCCAGAGCTATGATGTCGCG	<i>Cyprinus carpio</i> ; XM_042730675	157
<i>ccnb1</i>	Cyclin b1	Kontrolle der G2/M-Übergangsphase des Zellzyklus	TCAAAAATCGGAGAGGTTACAGC, TGCACTTGTGCTCCCTCTCTGG	<i>I. punctatus</i> ; NC_030443	103
<i>cp</i>	Ceruloplasmin	Kupfertransport, Oxidation von Eisen (Fe ²⁺ zu Fe ³⁺)	CCACAACGTTCTAGAAGAATCAITA, CTAAGAATGGAGGTCCAACATAAAA	<i>I. punctatus</i> ; JF914943	155
<i>cs</i>	Zitrat-Synthase	Aerober Stoffwechsel	GGTGGTGAAGTGTCGCAATGAAA, GCTAATGGGATGCTGTCCTGA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017487510	94
<i>hmox1a</i>	Häm-Oxygenase 1	Zelluläre Reaktion auf xenobiotischen Stimulus	GATTCTTCTGTGTTCCCTGTATG, CCAICTACTTCCTCAGGAGC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017491622	104

Anhang 10.2.3b: Liste erstellter Primer der untersuchten Referenz- und Zielgene bei *Clarias gariepinus* aus Hildebrand et al. (2023) und Hildebrand et al. (2024b).

Gen-Symbol Referenz-Gen:	Gen-Produkt	Funktion	Forward Primer (3'→5'), Reverse Primer (5'→3')	Quelle (Spezies; Archivnummer)	Amplikon Länge (bp)
<i>hsf</i>	Hitzeschock- Transkriptionsfaktor 1	ERK-Signalisierung, Stressreaktion	GTGCAGTCCATCAACTTTGATTC, CTATTCAGGAGTTGCTGTCAGAA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017455240	111
<i>hsp90ab1</i>	Hitzeschockprotein 90 alpha Familie Klasse b Mitglied 1	Chaperonfunktion, Stressreaktion	GAACATCAAGCTGGGCATCCAT, TACTACATCACTGGTGAGAGCA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017456214	167
<i>hspb1</i>	Hitzeschockprotein Familie b (klein) Mitglied 1	Differenzierung von Zelltypen, Stressreaktion	ACAGGACAACTGGAAGGTGAAC, GATTATCGGAAACCATGAGGAGA	<i>Clarias batrachus</i> ; KT359728	107
<i>hspd1</i>	Hitzeschockprotein Familie d (hsp60) Mitglied 1	Chaperonfunktion, Stressreaktion	GCACGCTTGTCTCAACAGGTT, AGACATGGCGATTGCTACTGGA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017469365	113
<i>igf1</i>	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1	Anabolismus, Wachstum	CGCCAAAACACCAAGAAACC, AGTGACGAGAAAGAGGAGCG	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200295	164
<i>il2</i>	Interleukin-2	Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten	GTCGGCTGGGAAAAAGCCAAT, TTATGTGTTTGACCCAGACAACG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017474923	162
<i>il4</i>	Interleukin-4	Aktivierung und Proliferation von Leukozyten	ATGAATCCTTGTGGAAGATTAGAG, GGAGTATTTGGTGAGAGAGGTAA	<i>P. hypophthalmus</i> ; XM_026924084	108
<i>il6</i>	Interleukin-6	Reaktion in der akuten Phase	GCAGTTGAAACGGGACTTCCCA, TGACCAAGCTTACCTGCCCTA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017455306	162
<i>kmt2a</i>	Lysin-spezifische Methyltransferase 2a	Regulierung der frühen Entwicklung und der Hämatopoese	ATTGGTCGAAATCGTCTGTAT, ATGATAAGTCTCAGTGGCAGGT	<i>I. punctatus</i> ; XM_017490460	121
<i>mtf1</i>	Metallregulatorischer Transkriptionsfaktor 1	Katabolische Regulierung der Knorpel	GTAGGAGGGCATTCAGGGAAAC, AGTCAGAACGCTGCCCCCTC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017475296	146
<i>nkx2-3</i>	NK2-Homöobox 3	Zelldifferenzierung	TACAGGACAACTGTGGAAAG, ACAACTCTTGTTCTCTGCTCTT	<i>I. punctatus</i> ; XM_017464595	119
<i>nr3c1</i>	Kernrezeptor-Unterfamilie 3 Gruppe c, Mitglied 1, Glucocorticoid-Rezeptor	Stressreaktion	TGTAGAAAGGCCAACACAACTATC, GAACCTAGAAAGCACGCAAAAACA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017492397	137
<i>oser1</i>	Auf oxidativen Stress reagierendes serinreiches Protein 1	Oxidativer Stress	AACTGGCATGGATGCAGTCGAA, ACCTACTGTAGCTCTAAAAATGCAA	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200453	120

Anhang 10.2.3c: Liste erstellter Primer der untersuchten Referenz- und Zielgene bei *Clarias gariepinus* aus Hildebrand et al. (2023) und Hildebrand et al. (2024b).

Gen-Symbol Referenz-Gen:	Gen-Produkt	Funktion	Forward Primer (3'→5'), Reverse Primer (5'→3')	Quelle (Spezies; Archivnummer)	Amplikon Länge (bp)
<i>osgin2</i>	Wachstumshemmer bei oxidativem Stress	Oxidativer Stress	AGGAGCCTGGCATGCAATGGA, GTGACCAATGACCGGGCCAC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017467887	129
<i>pgm3</i>	Phosphoglucomutase 3	Kohlenhydrat-Stoffwechsel	GACACAGGCGAGGGCTGAATCT, CTTCGTACAGCACACTGTAACC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017494096	112
<i>sirt1</i>	Sirtuin 1	Oxidativer Stress	AGTGAGGTGCTAGGGTTAATGG, TTGGTTCTTATCGCTTTATTCAGC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017461869	148
<i>slc30a5</i>	Solute Carrier Familie 30, Mitglied 5	Transport von Zink	AATAGTCACCAAAAGACAGTGGAT, CATCGTTGTGCTGAAACAACAG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017459891	134
<i>slc39a8</i>	Solute Carrier Familie 39, Mitglied 8	Aufnahme von Zink in die Zellen, Schutz vor entzündungsbedingten Verletzungen und Tod	TTTAACCTGATCTCAGCCATGTC, TAIGTCCCTGAGATGAATGCCA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017489708	151
<i>slc46a1</i>	Solute Carrier Familie 46, Mitglied 1	Folsäure-Transport	AATGGCGACATGCACAAGGGTAT, AGACAGCCTTGCCCCAGGG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017491375	129
<i>sp1</i>	SP1 Transkriptionsfaktor	Zellwachstum, Apoptose, Differenzierung und Immunreaktionen	AGCAGCAGGATGATCAGGGGA, GAGAAGCGTGACATGTCCATA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017450095	119
<i>st8sia4</i>	St8 alpha-n-Acetyl- Neuraminid alpha-2,8- Sialyltransferase	Synthese von Polysialinsäure für Zelladhäsionsmoleküle	GGTTCATGCAGTCAGAGGGTAC, CTTCTGGCATGAGATCCACTTG	<i>C. gariepinus</i> ; PRJNA820763	112
<i>stk39</i>	Serin/Threonin-Kinase 39	Stressreaktion	TGTAGTGTGCTGCTAACCTTC, AGATCCCTGACGAGGTGAAGC	<i>I. punctatus</i> ; XM_017469076	116
<i>tlr5</i>	Toll-like-Rezeptor 5	Erkennung von Bakterien	GGCAGCATGGGAAAGGGAGTT, GTTAAGGCTCTGATCTGTCCA	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200229	103
<i>tnf</i>	Tumor-Nekrose-Faktor alpha	Immunsystem/Akuthase-Reaktion	AAACCAGAGGAGAGCCCAAGAAAT, TCTATGACAGTGGTTGACAAACG	<i>I. punctatus</i> ; NM_001200172	130
<i>ucp2</i>	Entkopplungsprotein 2	Regulierung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, Funktion der Mitochondrien	GGCTCCAGATCCAAAGGGGAGA, CCACGTAAGTCTCTACAACGGG	<i>I. punctatus</i> ; XM_017489367	131
<i>zeb1</i>	Zinkfinger-E-Box-bindende Homeobox 1	Unterdrückung der Interleukin-2-Funktion	GCAGAGACCAAGCGGATGTAA, ATACGAGTGCCCCCAACTGTAAAA	<i>I. punctatus</i> ; XM_017483097	156

Anhang 10.2.4: Klassifizierungshorizont des Schweregrads histologischer Veränderungen im Gewebe nach Johnson et al. (2009).

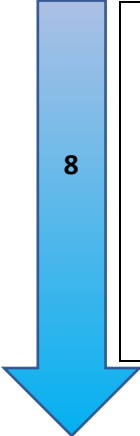
Ranking	Beschreibung
Nicht bemerkenswert	Dieser Grad wird verwendet, wenn es keine Befunde gibt, die mit einem bestimmten diagnostischen Kriterium verbunden sind.
Grad 1 (Minimal)	Von unauffällig bis kaum wahrnehmbar, aber so unbedeutend, geringfügig oder selten, dass nicht mehr als die niedrigste Einstufung gerechtfertigt ist. Bei diskreten Veränderungen wird Grad 1 verwendet, wenn weniger als 2 Vorkommen pro Abschnitt vorhanden sind. Bei multifokalen oder diffus verteilten Veränderungen wird dieser Grad für Prozesse verwendet, bei denen $\leq 20\%$ des Gewebes im Schnitt betroffen sind.
Grad 2 (Mild)	Ein auffälliges Merkmal des Gewebes. Bei diskreten Veränderungen wird Grad 2 verwendet, wenn pro Gewebeschnitt 3-5 Vorkommen vorliegen. Bei multifokalen oder diffus verteilten Veränderungen wird dieser Grad bei Prozessen verwendet, bei denen 20-50 % des Gewebes im Schnitt betroffen sind.
Grad 3 (Mäßig)	Ein dominierendes Merkmal des Gewebes. Bei diskreten Veränderungen wird Grad 3 verwendet, wenn pro Gewebeschnitt 6-8 Vorkommen vorliegen. Bei multifokalen oder diffus verteilten Veränderungen wird dieser Grad für Prozesse verwendet, bei denen 50-80% des Gewebes im Schnitt betroffen sind.
Grad 4 (Schwerwiegend)	Ein überwältigendes Merkmal des Gewebes. Bei diskreten Veränderungen wird Grad 4 verwendet, wenn mehr als 9 Vorkommen pro Gewebeschnitt vorhanden sind. Bei multifokalen oder diffus verteilten Veränderungen wird dieser Grad für Prozesse verwendet, bei denen $> 80\%$ des Gewebes im Schnitt betroffen sind.

Anhang 10.2.5: Vorschlag für ein Konditionierungsmodell zur Verbesserung eines Fütterungsprotokolls für *Clarias gariepinus* mittels Lichtkonditionierung.

	Meilenstein	Information	Referenz
1	Verwendete Art der Konditionierungstechnik	Klassische Konditionierungstechnik bei der die Fische auf einen bereits angelernten Reiz durch eine positive Reaktion auf einen neuen Reiz trainiert werden. Dies kann Licht und Futter sein.	Macaulay et al. (2021)
		Dabei kann auf technische Komponenten wie Zeitschaltuhren und Beleuchtung zurückgegriffen werden.	Agrillo et al. (2012)

2		Es kann auch ein soziales Training mit sog. Zeigerfischen genutzt werden um den Prozess zu beschleunigen.	Macaulay et al. (2021)
	Verwendeter Stimulus	Licht als wiederholender externer Reiz und Futter als positive Belohnung zur klassischen Konditionierung und Gewöhnung.	Macaulay et al. (2021)
	Voraussetzungen für erfolgreiche Konditionierung	Fische müssen über ausgebildete Sinne zur Wahrnehmung der zu Konditionierenden Reize verfügen. Fische sollten den Reiz von anderen Reizen in der Umwelt klar unterscheiden können. Voraussetzung der kognitiven Fähigkeit. Vermeidung von Störungen gegen den Lernerfolg des Fischbestands.	
	Ziel der Konditionierung	Erlernen einer Assoziation zwischen einem Reiz (Licht) und der Fütterung durch den Menschen oder Maschine. Verlust der natürlichen Scheu gegenüber Licht einwirkung durch positive Konditionierung. Abnahme der Stressreaktion oder Futterverweigerung. Verlängerung der Fütterungszeit durch erfolgreiche Konditionierung an Licht. Erlernen von atypischen Verhalten Effekt kann durch farbliche Futtermittel und Färbung des Haltungsbeckens als Kontrastmittel verstärkt werden.	Macaulay et al. (2021) Macaulay et al. (2021) Agrillo et al. (2012) Lee et al. (2014)

5		<i>C. gariepinus</i> differenziert rote, grüne und blaue Futtermittel.	Lee et al. (2014)
	Störungen der Konditionierung	Stress durch Handling, Umsetzen, Licht- und Ton-Schocks, Keschern, Unvorhersehbare Reize, Keine Versteck- oder Fluchtmöglichkeiten.	Agrillo et al., (2012), Macaulay et al. (2021), Gatto et al., (2021)
6	Alter der Fische bei Beginn der Konditionierung	Beginn der Konditionierung im frühen Entwicklungsstadium innerhalb der Produktionsumgebung.	Macaulay et al. (2021), Zhang et al. (2025)
		Neurogenese als Prozess zur Verarbeitung von Informationen und Gedächtnisbildung ist bei Frühstadien aktiver.	Macaulay et al. (2021)
		Ab dem Tag der ersten Nahrungsaufnahme (Tag 2) werden die Augen von <i>C. gariepinus</i> funktionsfähig.	Lee et al. (2014)
7	Wiederholungen in der Konditionierungsphase	Larven nutzen Augen für erfolgreiche Jagd nach Zooplankton/ Futtersuche.	Kawamura et al. (2017)
		Farbwahrnehmung selbst bei geringer Beleuchtung von 0,01 Lux.	Kawamura et al. (2017)
		12 Tage für Konditionierung mit 2 täglichen Trainingseinheiten. Bis zu 100 Durchgängen im Training (Tilapia, Guppy, Raubwels).	Levin & Levin, (1994), Gatto et al. (2021), Lee et al. (2014)
8	Nach Abschluss der Konditionierung	Mit sozialer Konditionierung (Zeigerfisch) möglicherweise weniger als 12 Tage.	Macaulay et al. (2021)
		Farbwahrnehmung von Jungstadien bis zu Altstadien von <i>C. gariepinus</i> gleichbleibend.	Lee et al. (2014)



	Erlernen von unnatürlichen Verhalten durch intensives Training. Erlerntes Verhalten im Larvenstadium erhält sich im Zuge des weiteren Wachstums was sich auf die Fütterungspraktik ausüben kann.	Agrillo et al. (2012) Macaulay et al. (2021)
--	--	--

Marc-Christopher Hildebrand

Adresse: St.-Georg-Str. 63
18057 Rostock

Geboren: 13.01.1989

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Telefon: 0 381 498 3746

Email: marc-christopher.hildebrand@uni-rostock.de

Akademische Ausbildung & Beruflicher Werdegang

12/2021 – 08/2025	Anstellung als Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Rostock im Projekt des EMFF „Welsaquakultur in MV 2“. Untersuchung von Nährstoffen für die Aquaponik im Zusammenhang mit dem Wohlergehen von <i>Clarias gariepinus</i> .
12/2021 – 06/2022	Ausbildung zum Forschungstaucher
01/2019 – 12/2022	Anstellung als Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Rostock im Projekt des EMFF „Welsaquakultur in MV“. Untersuchung von Afrikanischen Raubwelsen in Aquakulturanlagen in Mecklenburg-Vorpommern.
10/2014 – 06/2017	M.Sc Studium der Umweltwissenschaften - Umweltbiologie/ Ökologie an der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald. Masterarbeit: "Batemans principle and immunity in three sex-role-reversed Syngnathids".
10/2010 – 09/2014	B.Sc. Studium der Geologie/Mineralogie an der Universität Bergakademie Freiberg. Bachelorarbeit: „Charakterisierung von sedimentären Ablagerungen und Präzipitaten des Arbeitsgebietes Black Point nahe der Insel Panarea (Italien)“.
03/2013 - 12/2013	Ausbildung zum Wissenschaftlichen Taucher CMAS-Brevet

Publikationen

- Baßmann, B., Hahn, L., Rebl, A., Wenzel, L. C., Hildebrand, M-C., Verleih, M., & Palm, H. W. (2023). Effects of stocking density, size, and external stress on growth and welfare of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) in a commercial RAS. *Fishes*, 8(2), 74. Doi: doi.org/10.3390/fishes8020074
- Hildebrand, M-C., Rebl, A., Nguinkal, J. A., Palm, H. W., & Baßmann, B. (2023). Effects of Fe-DTPA on health and welfare of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Water*, 15(2), 299. Doi: doi.org/10.3390/w15020299
- Hildebrand, M-C., Hentrich, N., & Palm, H. W. (2024). The role of light in the rearing of *Clarias gariepinus* larvae: Effects on behavior, growth and survival. *Aquaculture Reports*, 39, 102420. Doi: doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102420
- Hildebrand, M-C., Rebl, A., Goldammer, T., Palm, H. W., & Baßmann, B. (2024). Effects of Zn-EDTA on the health and welfare of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), in a recirculating aquaculture system. *Frontiers in Aquaculture*, 3, 1383534. Doi: doi.org/10.3389/faquc.2024.1383534

Betreute Vorlesungen

2019 - 2025

Studiengang M.Sc. Aquakultur,
Universität Rostock, Modul: Technologie der
Fischaquakultur, Teil, Aquakultur-Hygiene/
Fischwohlergehen

2024

Weiterbildungsprogramm Sea-Ranger-Ausbil-
dung, Teil: Hygiene/ Fischwohlergehen/Trans-
port

Weiterbildungen & Öffentlichkeitsarbeit

2025	Radiosendung „Wellenlänge Wissenschaft“ des LOHRO, Rostock
2024	Forschungstaucherlehrgang: Einsatzleitung, Rostock
2022	Symposium Küste im Wandel des IOW, Warnemünde
2022	Thermo Fischer Gallery Anwendermeeting, Wasser und Umweltanalytik Fortbildung, Frankfurt
2022	Forschungstaucherlehrgang Nitrox Spezialisierung, Rostock
2021	Schulung Tiervermehrung bei Zuchtfischen, Rostock
2019, 2023	Meeresymposium, Hamburg
2019	Büsumer Fisch Tage, Büsum

Wissenschaftliche Tätigkeiten

2025	Teilnahme als Forschungstaucher an archäologischer Ausgrabung im SEASCAPES Projekt zum Thema „Entdeckung und Erforschung steinzeitlicher Großstrukturen am Grund der westlichen Ostsee“, Rostock
2020 - 2025	Teilnahme als Forschungstaucher am Projekt CONMAR Conmar-C-Spread-Modellierung und Simulation der strömungs und welleninduzierten Alterung von Weltkriegsmunition in der Ostsee, Rostock
2023 - 2024	Teilnahme als Forschungstaucher an archäologischen Ausgrabungen in dem Projekt INF zum Thema Steinzeit in der Ostsee, Rostock
2023	Teilnahme als Forschungstaucher am BMBF Projekt: Auswirkungen auf Nahrungsnetz, Mikrophytobenthos und Schlüsselarten Zoobenthos, Rostock
2019	Teilnahme an der EURORegionsWeek-Konferenz in Brüssel zum Thema: Nachhaltige Systeme (Aquaponik), Belgien

Praktika

2014	Auslandsexpedition Basra & Persischer Golf, Feldforschung und Dokumentation von Karstsystemen und mariner Ökologie, Irak
2012	Auslandsexpedition Vulkaninsel Panarea, Feldforschung und Dokumentation eines marinen Vulkansystems, Italien
2023 - 2024	Teilnahme als Forschungstaucher am Algenpraktikum der Marinen Ökologie (Praktikum), Rostock
2019	Bertelsmann AG (Klimabilanzierung, Digitalisierung), Gütersloh
2016	GEOMAR Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung, Praktikum in den Arbeitsgruppen der marinen Ökologie und Evolutionsökologie, Kiel
2013	Feldforschung für das Landesmuseum für Naturkunde Niedersachsen, Hannover
2013	Mitglied des Science Teams in der Bildungsstation „Forschungsreise“ in der Mineralogischen Sammlung Terra Mineralia, Freiberg

Schulausbildung

08/2000 – 06/2009	Allgemeine Hochschulreife An der Olof-Palme Gesamtschule Hiddenhausen
-------------------	---

Rostock, 28.08.2025
ORT, DATUM

UNTERSCHRIFT