

**Die Entwicklung der bakteriellen Gemeinschaft  
während der Ontogenese  
der Bachforelle (*Salmo trutta*)**

von Katharina Christine Keiz

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Die Entwicklung der bakteriellen Gemeinschaft  
während der Ontogenese  
der Bachforelle (*Salmo trutta*)**

von Katharina Christine Keiz

aus Starnberg

München 2024

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Mitbetreuung durch: Priv. -Doz. Dr. Sebastian Ulrich

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Dušan Palić

Tag der Promotion: 10. Februar 2024



Für meine Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>4</b>
<b>1</b>	<b>Die Bachforelle (<i>Salmo trutta</i>) .....</b>	<b>4</b>
1.1	Biologie der Bachforelle .....	4
1.1.1	Systematik und Beschreibung .....	4
1.1.2	Ontogenese .....	5
1.1.3	Nahrung .....	6
1.1.4	Temperatur .....	8
1.2	Verbreitung und Bedrohungsfaktoren .....	9
1.3	Wirtschaftliche und kulturelle Bedeutung .....	10
<b>2</b>	<b>Das Mikrobiom .....</b>	<b>12</b>
2.1	Definitionen .....	12
2.1.1	Mikrobiom und Mikrobiota .....	12
2.1.2	Kernmikrobiom .....	13
2.2	Einfluss der Mikrobiota auf den Wirtsfisch .....	16
2.3	Einflüsse auf das Mikrobiom .....	18
2.3.1	Futter .....	18
2.3.2	Äußere Einflüsse .....	19
2.3.3	Fischhaltung in der Aquakultur .....	22
2.3.4	Krankheiten .....	24
2.3.5	Medikamente, Probiotika und Präbiotika .....	25
<b>3</b>	<b>Mikrobiomanalyse mittels Next-Generation Sequencing .....</b>	<b>28</b>
3.1	<i>16S-rRNA</i> -Genamplikon-Sequenzierung .....	28
3.2	Next-Generation Sequencing von Illumina .....	31
3.2.1	Vorbereitung der Sequenzierungsbibliothek .....	32
3.2.2	Cluster Generierung .....	33
3.2.3	Sequenzierung .....	35
3.3	Datenanalyse .....	36
3.3.1	Alpha-Diversität .....	37
3.3.2	Beta-Diversität .....	38

---

<b>III.</b>	<b>PUBLIKATION .....</b>	<b>40</b>
<b>1</b>	<b>Publikation Fischmikrobiom.....</b>	<b>40</b>
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>66</b>
1.1	Durchführung .....	67
1.1.1	Haltung .....	67
1.1.2	Probenahmeverfahren und Herausforderungen.....	69
1.2	Vergleichbarkeit der Studien.....	70
1.3	Kernmikrobiom .....	71
1.4	Besatzversuch.....	73
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>80</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>82</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>84</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>115</b>
<b>IX.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>116</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ASV	amplicon sequence variant (dt. Amplikonsequenzvariante)
BG	Bakterielle Gemeinschaft
Bp	Basenpaare
DNA	deoxyribonucleic acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	deoxynucleotide triphosphate
dpf	days post fertilization (dt. Tage nach der Befruchtung)
ESV	exact sequence variant
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (dt. Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen)
FIFO	fish in fish out (FIFO) ratio
GIT	Gastrointestinaltrakt
IMNGS	Integrated Microbial Next Generation Sequencing
MDS	Multidimensionale Skalierung
NGS	next-generation sequencing
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
OTUs	operational taxonomic unit (dt. operationale taxonomische Einheit)
PCR	polymerase chain reaction (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	ribonucleic acid (dt. Ribonukleinsäure)
rRNA	ribosomale RNA
SBS	sequencing by synthesis (dt. Sequenzierung durch Synthese)
sp.	Spezies
spp.	Spezies (Plural)
V1-V9	neun hochvariable Regionen der 16S-rRNA
zOTU	zero-radius OTU

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Bachforelle ( <i>Salmo trutta</i> ) .....	5
Abbildung 2: Ontogenese der Forellen .....	6
Abbildung 3: Entwicklung der Bachforelle vom Ei zur fressfähigen Brut.....	7
Abbildung 4: Hyphen und Oogonien von <i>Saprolegnia</i> sp. von der Oberfläche einer beprobten Bachforelle .....	17
Abbildung 5: Bachforelle aus der Aquakultur .....	23
Abbildung 6: 16S ribosomal RNA.....	30
Abbildung 7: Ablauf von Experimenten mit thematischer Zielsetzung der Mikroorganismenanalyse .....	31
Abbildung 8: Sequenzierungsgerät Illumina MiSeq.....	31
Abbildung 9: Vorbereitung der Sequenzierungsbibliothek. ....	32
Abbildung 10: Schematische Darstellung eines Dual-Index-Fragments. ....	33
Abbildung 12: MiSeq-Fließzelle.....	33
Abbildung 13: Cluster Amplifikation .....	34
Abbildung 14: Sequenzierung.....	36
Abbildung 15: <i>richness</i> von Fisch- und Umweltmikrobiomproben. ....	37
Abbildung 16: Graphische Darstellung der $\beta$ -Diversität als MDS - Plot.....	39
Abbildung 17: Beprobung der Bachforellen .....	67
Abbildung 18: Brutrinnen mit Siebeinsätzen.....	68
Abbildung 19: Verteilung der Fische in den Rinnen in Starnberg.....	74
Abbildung 20: Bakterienfamilien der Fisch- und Umweltproben.....	76
Abbildung 21: $\beta$ -Diversität der Fisch- bzw. Umweltproben in den beiden Fisch- zuchten.....	77
Abbildung 22: $\beta$ -Diversität der Schleimhautproben in den beiden Fischzuchten	78

## I. EINLEITUNG

Mit ungefähr 32.000 verschiedenen Spezies stellt das monophyletische Taxon der Fische mehr als die Hälfte der rund 60.000 Wirbeltierarten unserer Erde dar (NELSON et al., 2016). Nicht nur hinsichtlich ihrer Diversität und ihrer Bedeutung in den Ökosystemen spielen sie eine wichtige Schlüsselrolle (ATTAYDE & HANSSON, 2001; MATTOCKS et al., 2017). Für die menschliche Ernährung sind sie als Quelle von hochwertigem Protein, und einem weltweiten Pro-Kopf-Konsum von über 20kg/Jahr von herausragender Bedeutung (FAO, 2022). Mit einer schnell wachsenden Weltbevölkerung (NATIONS, 2019) wächst dieser Bedarf weiterhin und kann auf Grund rückläufiger Fischbestände durch den Fischfang nicht gedeckt werden (COSTELLO et al., 2016; FAO, 2022). Entsprechend wird prognostiziert, dass der Anteil an in der Aquakultur produziertem Fisch weiter steigen wird (KOBAYASHI et al., 2015). Die in Deutschland produzierte Menge an Süßwasserfisch ist seit Jahren rückläufig und so betrug 2021 der Eigenversorgungsgrad beim Süßwasserfisch nur 19% (BRÄMICK, 2006, 2013, 2021). Zu den auf dem deutschen Markt besonders begehrten Salmoniden gehören Lachse, Forellen und Saiblinge. Die Bachforelle ist hinsichtlich der produzierten Menge auf Platz 6 der in Deutschland erzeugten Fische (DESTATIS, 2022). Da deren natürlichen Bestände rückläufig sind, werden die Fische zudem in großem Maß als Besatzfisch produziert (MUELLER et al., 2018).

Verschiedene Salmonidenarten, allen voran Lachse, werden weltweit in großen Netzgehegen in Küstengebieten aufgezogen. Diese Art der Aquakultur führt zu ökologischen Problemen, wie der ungefilterten Emission von Medikamenten und Fäkalien in das umgebende Wasser oder der Erhöhung des Drucks von Parasiten aus den Netzgehegen auf die Wildfischpopulationen (BURRIDGE et al., 2010; LOVE et al., 2020; MORIARTY et al., 2023). Die Binnenproduktion von Forellen in kleinen Teichanlagen hingegen kann mit Filtersystemen und Absetzbecken den Eintrag von schädlichen Substanzen in die Umwelt minimieren (HOESS & GEIST, 2022). Der Wegfall langer Transportwege ist überdies hinsichtlich der Ökobilanz ein weiterer Vorteil der lokalen Fischproduktion (PIROG et al., 2001). Besonders die Erzeugung von kaltstenothermen Fischen wie Salmoniden, die meist in Durchflussanlagen produziert werden, ist jedoch auf kontinuierliche Verfügbarkeit von

kaltem Wasser angewiesen (ELLIOTT & ELLIOTT, 2010). Durch den Klimawandel werden extreme Wetterereignisse wie Niedrigwasserabflüsse und hohe Wassertemperaturen zunehmen und die Binnenaquakultur vor neue Herausforderungen stellen (BRANDER, 2007; BÖHNISCH et al., 2021). Die Optimierung der Haltungsbedingungen ist daher von entscheidender Bedeutung für ein zukunftsfähige Fischzucht. Neben klassischen Maßnahmen wie z.B. der künstlichen Anreicherung der Teiche mit Luftsauerstoff durch Belüftungssysteme (ABDELRAHMAN & BOYD, 2018) und einer optimierten Fütterung (ARZEL et al., 1994) ist der Bedarf an innovativen Eingriffsmöglichkeiten groß. Ein Ansatzpunkt hinsichtlich der Fischgesundheit könnte das Verständnis des Mikrobioms der Bachforelle sein. Die bakterielle Gemeinschaft (BG), als Teil des Mikrobioms der Aquakulturfische, wurde von der Wissenschaft bereits mit großem Interesse wahrgenommen, doch steckt die Forschung hierzu noch in den Kinderschuhen. Die existierende Forschung legt nahe, dass ein funktionierendes Mikrobiom für die Gesundheit und Immunabwehr des Wirts, z.B. des Fisches, wesentlich ist. (MCFALL-NGAI et al., 2013; FOSTER et al., 2017). Eine Dysbiose, also das Ungleichgewicht der mikrobiellen Gemeinschaft, hat somit einen einschneidenden Einfluss auf den Wirtsorganismus Fisch (VASEMÄGI et al., 2017).

Die bereits existente Mikrobiomforschung kommt nicht immer zu konsistenten Ergebnissen, und es bedarf daher weiterer Studien, besonders für das Erreichen eines grundsätzlichen Verständnisses, wie die Varianz des Mikrobioms von gesunden Fischen in verschiedenen Entwicklungsstadien aussieht.

Fische sind wie alle aquatische Organismen ihr ganzes Leben lang von Wasser und den darin lebenden Mikroorganismen umgeben und folglich unmittelbarer als terrestrische Organismen mit dem sie umgebenden Mikrobiom konfrontiert (ELLIS, 2001). Während einige Autoren beschreiben, dass Faktoren wie das Futter eine größere Rolle spielen könnten als das Mikrobiom des umgebenden Wassers, und dass die Mikroorganismen, die den Wirt besiedeln, nicht unbedingt den Mikrobiota des Habitats entsprechen müssen (BURGOS et al., 2018), zeigen erste Studien eine deutliche Änderung des Mikrobioms im Falle eines Habitatswechsels (TARNECKI et al., 2019; WEBSTER et al., 2020). Weitere Studien zeigen die Unterschiede zwischen Fischen aus Fischzuchten und Wildfischen und führen dies zum Teil auf den Unterschied zwischen industriellem Futter und natürlicher Nahrung wie Makroinvertebraten zurück (BOHLIN et al., 2002; LAVOIE et al., 2018). Welche Rolle

hierbei auch das Mikrobiom des Habitats spielt, bleibt unklar.

Die klassische Mikrobiologie, mittels derer in der Vergangenheit ein großer Teil des Wissens über die Mikrobiota von Fischen gewonnen wurde, basiert auf der Kultivierung von Mikroorganismen und der optischen Identifikation mittels Mikroskopie (AUSTIN, 2006). Eine sichere Bestimmung ist mit dieser Methode jedoch nicht immer möglich und die Anzucht ist zudem sehr zeitintensiv (VENTER et al., 2004; ECKBURG et al., 2005). Darüber hinaus ist ein großer Teil der Mikroorganismen bis heute nicht kultivierbar (STEWART, 2012). Die gebräuchlichsten Kultivierungsverfahren eignen sich nicht für Mikroorganismen, die Habitate und Wirte mit außergewöhnlichen physikalischen und chemischen Parametern besiedeln. So können z.B. viele Bakterien, die auf Fischen gefunden werden, nicht mit den üblichen Methoden kultiviert werden (SPANGGAARD et al., 2000; HUBER et al., 2004). Bereits seit 20 Jahren bietet das Next-Generation Sequencing (NGS) die Möglichkeit einer genomischen Hochdurchsatzanalyse (VOELKERDING et al., 2009). Die wichtigste Zielregion (targeted sequencing approaches; deutsch: zielgerichtete Sequenzierungskonzepte) für die Erforschung der bakteriellen Evolution und Ökologie ist das Gen der 16S-rRNA. Die Sequenzierung des *16S-rRNA*-Gens benötigt keine Anzucht und gewährt zugleich genauere Einblicke in verwandtschaftliche Beziehungen, ermöglicht die Erstellung von Stammbäumen und liefert somit ein wichtiges Instrument bei der Charakterisierung des phylogenetischen Aufbaus von mikrobiellen Gemeinschaften (OLSEN et al., 1994). Sie bildet somit die Grundlage der modernen Mikrobiomforschung.

Für die Einordnung der Ergebnisse der bisher existierenden Studien ist ein grundlegendes Verständnis des Mikrobioms und der BG von Bachforellen von entscheidender Bedeutung. Neben der Möglichkeit der Manipulation der BG und des Mikrobioms bietet ein weitreichendes Verständnis des Mikrobioms auch die Möglichkeit, eine Dysbiose frühzeitig zu erkennen und ggf. vor dem Ausbruch einer Infektion gegenzusteuern. Ziel dieser Arbeit ist daher die Charakterisierung der BG der Bachforelle während der frühen Entwicklung vom Ei bis zur Brut und der auftretenden Verschiebungen der Zusammensetzung mittels *16S-rRNA*-Genamplikon-Sequenzierung.



## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1 Die Bachforelle (*Salmo trutta*)

#### 1.1 Biologie der Bachforelle

##### 1.1.1 Systematik und Beschreibung

Die Bachforelle (*Salmo trutta*; Linnaeus, 1758) gehört zur Familie der Salmonidae, zur Unterordnung der Salmoniformes und damit zur Überordnung der Teleostei (Echte Knochenfische (STERBA, 1959; STORCH & WELSCH, 2004)).

Die Systematik von *Salmo trutta* ist komplex und je nach Literaturquelle wird die Art in Unterarten, Ökotypen oder Formen unterteilt (PAKKASMAA & PIIRONEN, 2001). Früher war die Einteilung der Spezies in drei Unterarten, die Meerforelle (*Salmo trutta trutta*), die Seeforelle (*Salmo trutta lacustris*) und die Bachforelle (*Salmo trutta fario*) üblich (BEHNKE, 1972). Heute spricht man meistens von den drei verschiedenen Ökotypen/Formen derselben Art (KOTTELAT & FREYHOF, 2007). Das Hauptunterscheidungskriterium der drei Formen ist ihr Wanderverhalten. Während die Bachforelle permanent im Fließgewässer bleibt, wechseln die See- und Meeresforelle ihre Habitate während des Lebenszyklus. Beide letztgenannten Formen laichen in Fließgewässern ab, verbringen jedoch den größten Teil ihres Lebens im Binnensee bzw. im Meer. Verschiedene Fischarten zeigen auf Artniveau trennbare Ökotypen. Der Dreistachlige Stichling zeigt beispielsweise ebenfalls unterschiedliche Ökotypen, die sich hinsichtlich Körpergröße, Ernährungsweise und Färbung unterscheiden, jedoch an der gleichen Stelle reproduzieren, ohne dass es zu einer genetischen Vermischung kommt (MARQUES et al., 2019). Auch andere Forscher beschreiben, dass Habitat, Futter und Fließgeschwindigkeit beim Seesaibling (*Salvelinus alpinus*), der wie die Forellen zur Familie Salmonidae gehört, ebenso wie bei Stichlingen, Einfluss auf die morphologische Plastizität wie die Größe oder die Körperform haben (SANDLUND et al., 1992; DAY et al., 1994). Die morphologischen Unterschiede zwischen Fischpopulationen können jedoch größer sein als die Unterschiede zwischen den verschiedenen Formen (PAKKASMAA & PIIRONEN, 2001).

Die nachstehende Beschreibung bezieht sich auf den stationären Ökotypus Bachforelle, der sein ganzes Leben im Fließgewässer verbringt. Der natürliche Lebensraum der Bachforelle sind die Oberläufe von Fließgewässern, die sog. Forellenregion, einer Fischregion die nach der Bachforelle benannt ist und deren Leitfisch sie ist (STERBA, 1959; JUNGWIRTH et al., 2003).



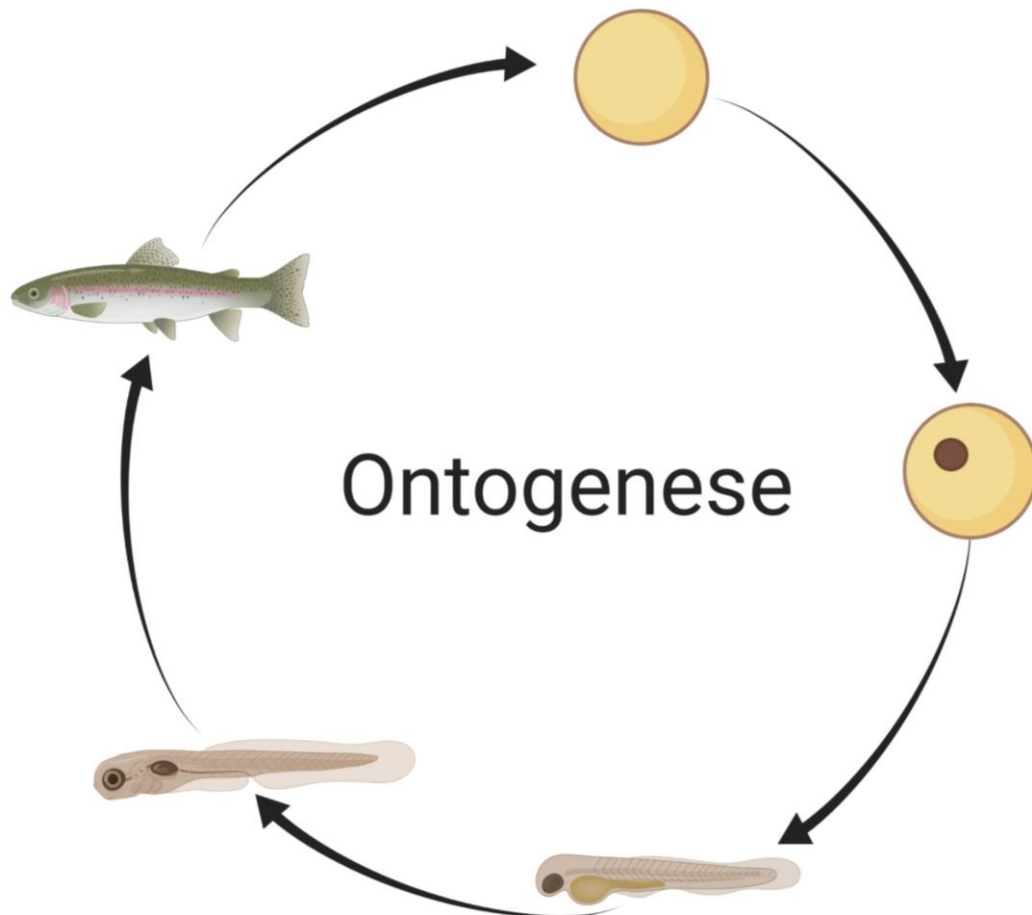
**Abbildung 1: Bachforelle (*Salmo trutta*)**

Die Bachforelle hat einen torpedoförmigen Körper, der seitlich mäßig zusammengedrückt ist. Die Schwanzflosse ist nur wenig oder gar nicht eingeschnitten. Die Färbung ist unterschiedlich und kann zum Beispiel von olivgrün bis braungrün oder auch hell gelblich reichen und sich von Population zu Population unterscheiden. Die Musterung besteht charakteristisch aus schwarzen und roten Flecken mit hellen Höfen. Wie alle Salmoniden verfügt die Bachforelle über die typische Fettflosse, die meist ebenfalls rot gepunktet ist (siehe Abbildung 1; STERBA, 1959).

### 1.1.2 Ontogenese

Die Laichzeit der Bachforelle ist von Oktober bis Januar und ist abhängig von der Population und den Umweltbedingungen (STERBA, 1959; RIEDL & PETER, 2013). Als Laichhabitat benötigt *Salmo trutta* sauerstoffreiches Wasser und kiesiges Substrat, in das das Weibchen, auch Rogener genannt, mit dem Schwanz eine Laichgrube schlägt und im hyporheischen Interstitial, den durchströmten Zwischenräumen des Kiessediments, ihre Eier ablegt (STERBA, 1959; ARMSTRONG et al., 2003). Ein (dominantes) Männchen, auch Milchner genannt, gibt gleichzeitig oder direkt danach sein Spermium in das Wasser über den Eiern ab (CHAMPIGNEULLEC & GUYOMARD, 2001). Der Zeitpunkt des Schlupfs liegt – abhängig von der Temperatur – ca. 1-1,5 Monate nach dem Abläichen (ELLIOTT, 1994). Die Dottersacklarven verbleiben im Interstitial bis der Dottersack fast vollständig aufgebraucht ist. Anschließend verlassen sie das Kiesbett, um mit der Nahrungsaufnahme zu beginnen (ELLIOTT, 1986). Die Jungfische bevorzugen nach

dem Schlupf flaches Wasser und wandern während des ersten Sommers flussabwärts in meist tiefere Abschnitte des Flusses (VØLLESTAD et al., 2012). Während die See- und die Meeresform nach wenigen Jahren abwandern, bleibt die Bachforelle im Fließgewässer und wandert nur innerhalb des Gewässersystems, um ein für sie ideales Habitat zu besetzen. Bachforellen sind innerhalb des Fließgewässers territorial und verteidigen ihr Habitat gegen andere Bachforellen (JOHNSON & FORSER, 2002).



**Abbildung 2: Ontogenese der Forellen**

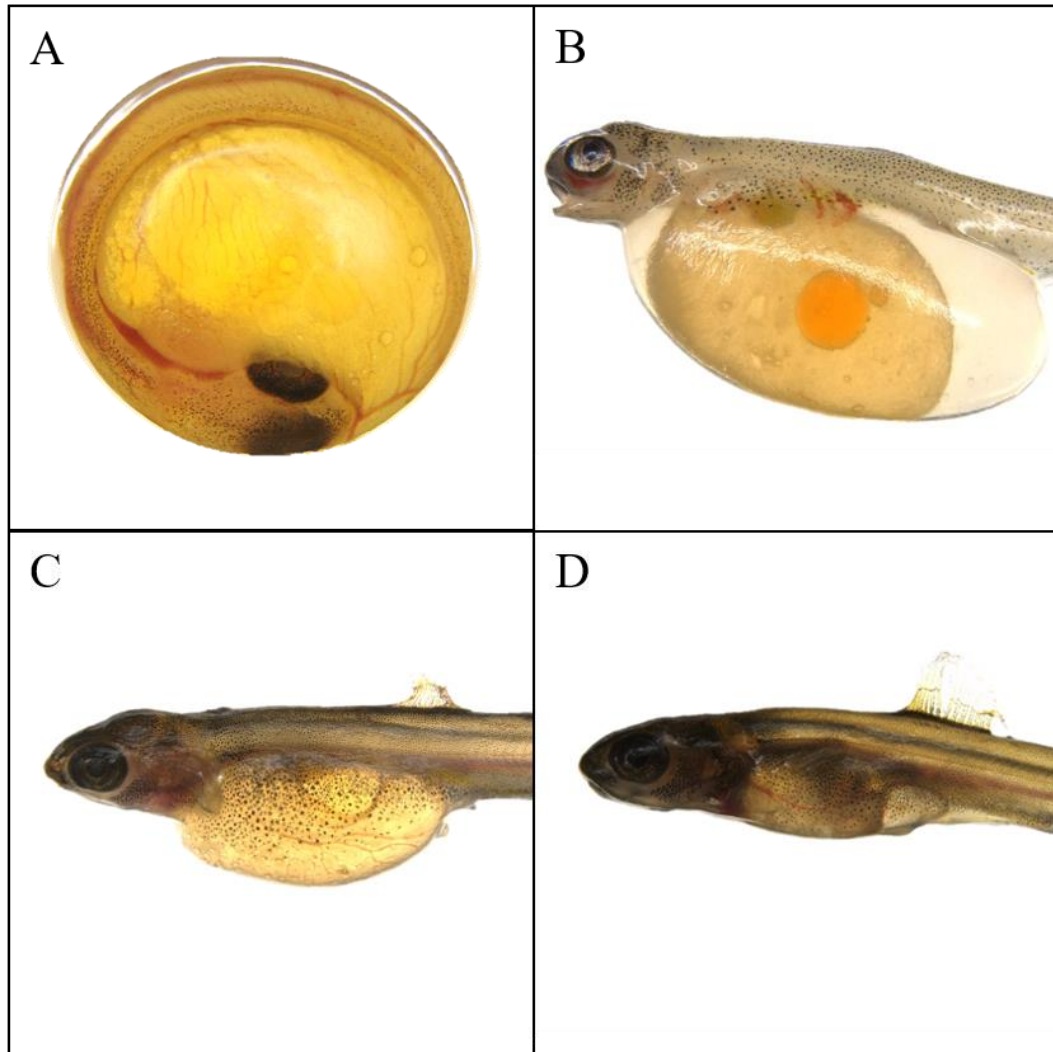
Von oben beginnend im Uhrzeigersinn dargestellt sind: unbefruchtetes Ei, befruchtetes Ei im Augenpunktstadium, Dottersacklarve, fressfähige Brut, adulter Fisch.

Abbildungen nicht maßstabsgerecht. Abbildung erstellt mit BioRender.com

### 1.1.3 Nahrung

Forellen sind Prädatoren und im Laufe ihrer Entwicklung reicht das Nahrungsspektrum von verschiedenen aquatischen Organismen, beginnend bei Zooplankton, Makrozoobenthos, kleinen Krebsen bis hin zu anderen Fischen (STERBA, 1959; ELLIOTT, 1967). Die Bachforelle besitzt ein endständiges zahnbewertes Maul, das

nicht geeignet ist, um Nahrung vom Boden aufzunehmen. Als Raubfisch fängt sie mit schnellen Bewegungen ihre Beute, die unzerkleinert verschluckt wird. Die Speiseröhre mündet in den Magen, in dem die enzymatische Verdauung stattfindet. Durch den *Pylorus* sind Magen und Mitteldarm voneinander getrennt. Direkt hinter dem Übergang von Magen in den Mitteldarm befinden sich bei der Forelle die



**Abbildung 3: Entwicklung der Bachforelle vom Ei zur fressfähigen Brut**

(A) Augenpunktstadium; (B und C) Dottersackbrut; (D) fressfähigen Brut, bei der der Dottersack fast vollständig aufgezehrt ist. Abbildungen nicht maßstabsgerecht.

Pylorusanhänge - schlauchförmige Ausstülpungen, die histologisch dem Mitteldarm gleichen. Sie vergrößern die Absorptionsfläche des relativ kurzen Darms. Im Mitteldarm wird die Nahrung durch Enzyme weiter verdaut und die Nährstoffe werden über die einschichtigen Zylinderepithel aufgenommen. Der ungefaltete Mitteldarm geht direkt in den sehr kurzen Enddarm über. Die unverdauten Nahrungs-

reste verlassen den Körper als schleimhüllter Kotfaden (SCHWARZ, 2017). Direkt nach dem Schlupf zehrt die Brut von dem namensgebenden Dottersack (siehe Abbildung 3 B). Wenn der Dottersack fast aufgebraucht ist, beginnt die fressfähige Brut die Futterraufnahme und ernährt sich zu Beginn von Makrozoobenthos wie z.B. Köcher-, Eintagsfliegenlarven oder Zuckmückenlarven und Zooplankton (SKOGLUND & BARLAUP, 2006; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ et al., 2011; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ & COBO, 2012). Wenn der Dottersack gänzlich verschwunden ist, erweitert sich das Nahrungsspektrum, da die Brut nun beweglicher und für sie auch schwerer zu erjagende Beute erreichbar ist (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ et al., 2011). Während jüngere Individuen sich primär von aquatischen Kleinorganismen ernähren, wechseln größere Individuen zu einer teils piscivoren Ernährung und fressen überdies auch terrestrische Invertebraten, z.B. Insekten auf der Wasseroberfläche (JENSEN et al., 2012; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ & COBO, 2012).

#### 1.1.4 Temperatur

Als poikilotherme Organismen sind Fische in besonders großem Maß von der Umgebungstemperatur abhängig, da sie die eigene Körpertemperatur nicht aktiv steuern und aufrecht erhalten können (BOLTAÑA et al., 2017). Die Bachforelle gehört zu den kaltstenothermen Arten und bevorzugt somit niedrige Wassertemperaturen und kann nur in einem engen Temperaturbereich überleben (WYSOCKI et al., 2009). Im Gegensatz zu eurythermen Arten, die in ihrem Habitat ein weites Temperaturspektrum tolerieren, sind stenotherme Fische wie Forellen allgemein empfindlich gegenüber Temperaturschwankungen (LOGAN & BUCKLEY, 2015). Für die Eientwicklung von Bachforellen sind Temperaturen zwischen 8 und 10 °C optimal (OJANGUREN & BRANA, 2003), wohingegen ältere Entwicklungsstadien mit höheren Temperaturen zurechtkommen. So liegt die ideale Temperatur während der Entwicklung laut RÉALIS-DOYELLE *et al.* (2016) bei 6 - 10 °C. Bei höheren Temperaturen nimmt die Überlebensrate der Tiere im Stadium der ersten Futterraufnahme (Ende Dottersackstadium) drastisch ab. Bei 4 °C ist laut der Studie die Überlebensrate hingegen sehr hoch, jedoch war die Deformationsrate deutlich erhöht. ELLIOTT (1975) fand keinen Unterschied im Bereich zwischen 6,8 und 19,3 °C, während FORSETH and JONSSON (1994) eine Optimaltemperatur von 16 °C bzgl. Zuwachs ermittelten. Grundsätzlich steigt mit der Wassertemperatur

die Zuwachsrates (SWIFT, 1961) bis das Optimum verlassen wird und es zu Schädigungen oder zum Tod der Forelle kommt. Die hohen Ansprüche an die Wassertemperatur sind für die Bachforelle vor dem Hintergrund des Klimawandels problematisch (siehe auch nachstehendes Kapitel: 1.2 Verbreitung und Bedrohungsfaktoren).

## 1.2 Verbreitung und Bedrohungsfaktoren

Die Bachforelle ist eine in Europa heimische Art, die in Eurasien und Nordafrika vorkommt (ELLIOTT, 1989) und der am weitesten verbreitete Süßwasserfisch in der paläarktischen Region (BERNATCHEZ, 2001). Im Norden reicht ihr Verbreitungsgebiet bis nach Island, Russland und den nördlichen Teil von Skandinavien (ELLIOTT, 1994).

Durch den Menschen wurde sie zusätzlich in mindestens 24 Ländern aktiv in die Gewässer eingebracht und findet sich nun weltweit in vielen Gebieten, die nicht zu ihrem ursprünglichen Verbreitungsgebiet gehören (siehe auch 1.3 Wirtschaftliche und kulturelle Bedeutung) (STERBA, 1959; ELLIOTT, 1994).

Die Europäische Rote Liste führt keine Unterarten, Formen oder Ökotypen, sondern nennt nur die Art *Salmo trutta*, und listet sie als *ungefährdet* (BROOKS, 2011). Nach der Roten Liste für Bayern wird der Ökotyp der Bachforelle auf der Vorwarnliste geführt, was bedeutet, dass sie nicht als gefährdet eingestuft wird, ihr Erhaltungszustand sich aber in den nächsten zehn Jahren verschlechtern könnte (EFFENBERGER et al., 2021). Wie auch bei anderen kieslaichenden Arten, ist der Bestand der Bachforelle in Bayern in den letzten 30 Jahren stark zurückgegangen (MUELLER et al., 2018). In der Schweiz, in der umfangreiche Erhebungen zur Entwicklung der Fänge durch die Angelfischerei existieren, haben sich die Fänge der Bachforelle bereits zwischen 1985 und 1999 halbiert (BURKHARDT-HOLM et al., 2002). Die derzeitige stabile Population der Bachforelle in Bayern ist auf die starken Besatzaktivitäten der Angler zurückzuführen, wobei die Bachforelle eine der am häufigsten besetzten Fischarten in Bayern ist (EFFENBERGER et al., 2021). Aufgrund ihres hohen wirtschaftlichen Wertes werden große Anstrengungen zur Erhaltung und Bewirtschaftung vor allem in Form von Besatzmaßnahmen unternommen (LEMOPOULOS et al., 2019). Ohne Besatz wäre die Bachforelle wie die meisten Flussfischarten aufgrund der zahlreichen Beeinträchtigungen der Gewässer in Bayern deutlich gefährdet (EFFENBERGER et al., 2021).

Die Beeinträchtigung des Lebensraum der Bachforelle ist vielschichtig und wird durch verschiedene Faktoren, wie z.B. Wasserverschmutzung, Landnutzungsänderungen im Einzugsgebiet und Verlust von Gewässerstrukturen beeinflusst (ARTHINGTON et al., 2016; MUELLER et al., 2020). Neben terrestrischen Prädatoren wie Kormoran und Fischotter, spielen auch invasive aquatische Neobiota, die in Konkurrenz um Habitat und Nahrung zu den heimischen Organismen stehen oder die heimische Diversität anders beeinflussen, eine kritische Rolle (ORMEROD et al., 2010; STEFFENS, 2010). Überdies stellt der Klimawandel für die Bachforelle als kaltstenotherme Fischart eine große Bedrohung dar. Hohe Wassertemperaturen bedeuten physiologischen Stress (also eine Überschreitung der Temperatur, bei der die Körperfunktionen normal funktionieren) für die Art und begünstigen zudem das Auftreten von Krankheiten. BORGWARDT et al. (2020) modulierten für Österreich in einer Studie, dass sich der Lebensraum für Kaltwasserarten verkleinert und die Bachforelle künftig nur noch flussaufwärts in höheren Lagen geeignete Habitate finden wird. Eine weitere Bedrohung für die Fischfauna sind Lebensraumfragmentierung und -verlust. Der Habitatverlust betrifft vor allem rheophile Fischarten, also Fische, die wie die Bachforelle schnellströmende Gewässer bevorzugen. Ihre Lebensräume sind deutlich zurückgegangen, unter anderem durch Habitatdegradierung und Fragmentierung der Gewässerabschnitte (AARTS et al., 2004). Ursache hierfür sind Wehre und andere Querbauwerke wie z.B. für Hydroenergie. Wasserkraftanlagen sind eine der größten Bedrohungen für Flussfischarten. Sie zerschneiden nicht nur die Wanderrouten diadromer und potamodromer Fischarten und beeinflussen damit kritische Lebensstadien wie die Fortpflanzung negativ bzw. verhindern diese komplett. Ihre Turbinen können Fische schädigen oder töten (BIERSCHENK et al., 2018). Eine artspezifische Bedrohung der Bachforelle ist überdies das „Proliferative Darkening Syndrome“ – dessen Auftreten in Deutschland auch als „Bachforellensterben“ bezeichnet wird – eine tödliche Erkrankung, bei der die Bachforelle sich dunkel verfärbt. Die Krankheit tritt nur in alpinen bayerischen Kalkflüssen auf und ihre Auslöser sind noch nicht bekannt (FUX et al., 2019).

### **1.3      Wirtschaftliche und kulturelle Bedeutung**

Salmoniden sind begehrte Speisefische und stellen eine gute Quelle für hochwertige tierische Proteine dar (COOKE et al., 2018; MUELLER et al., 2018). Auf Grund ihres wirtschaftlichen Werts gehört die Bachforelle zu den am besten erforschten

Fischarten weltweit (KLEMETSEN et al., 2003).

Bereits im Jahr 1884 wurden in den USA erstmals Bachforellen in den Baldwin River besetzt und bis heute findet auf Grund der Popularität des beliebten Angelfisches ein starker Nachbesatz in ganz Michigan und anderen Teilen der USA statt (ZORN, 2017). Fischbesatz, also das Einbringen von in der Aquakultur produzierten Fischen in ein natürliches Gewässer, ist eine häufig eingesetzte Managementmaßnahme um Bestände zu stützen, die durch die Entnahme durch die Fischerei oder andere Faktoren dezimiert wurden (COWX, 1994). Um die Attraktivität der Angelfischerei zu erhöhen, werden jedoch auch gebietsfremde Fischarten besetzt. Die weltweite Einführung der Bachforelle in fremde Ökosysteme hatte negative Folgen. In Australien wurde die Bachforelle ebenfalls bereits in den 1860er Jahren eingeführt und stellt dort als Spitzenprädatoren eine Bedrohung für heimische Tiere wie Frösche, Fische und Krebse dar (CADWALLADER, 1996). Dennoch ist die Bachforelle auch dort ein Hauptziel der Freizeitfischerei und wird daher weiter in großem Maß besetzt (JACKSON et al., 2004). Auch in Europa und in Deutschland ist die Bachforelle von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Fast 40 % der in ganz Deutschland besetzten Fische sind Bachforellen (PAGEL & ARLINGHAUS, 2015). Die Menge an Bachforellen für den Besatz wird im Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2020 nicht ausgewiesen, jedoch wird für die Bachforelle und Saiblinge gemeinsam von einer Menge von 11 Mio. Jungtieren ausgegangen (BRÄMICK, 2020). In der Schweiz ist die Bachforelle der beliebteste Angelfisch und auch in Bayern ist die Bachforelle so attraktiv für die Angelfischerei, dass sie die am häufigsten besetzte Art ist (KIRCHHOFER et al., 2007; EFFENBERGER et al., 2021).

Neben der Bedeutung als Satzfish für die Angelfischerei ist die Bachforelle auch ein beliebter Speisefisch. Mit 618 t Produktionsgewicht im Jahr 2019 ist sie auf Platz sechs der am häufigsten in der Aquakultur produzierten Fische in Deutschland, innerhalb der Salmoniden nur übertroffen von der Regenbogenforelle und dem Elsässer Saibling, einer Kreuzung aus Seesaibling (*Salvelinus alpinus*) und Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis*; (DUMAS et al., 1992; BRÄMICK, 2020; FIZ, 2021). Die Bedeutung der Bachforelle als Speisefisch mit direkter Vermarktung könnte in Zukunft zudem steigen. Die Nachfrage nach lokal produzierten Lebensmitteln hat in den letzten Jahren zugenommen. Gleichzeitig ist die Produktion von Lachsen in Netzkäfigen und deren negative ökologische Folgen in der Fachliteratur



und Presse kritisch begleitet worden (GRUNERT, 2011). Deutschland ist zudem einer der größten Importeure von Fisch, was dem Wunsch nach Nachhaltigkeit und regionaler Produktion aktuell noch widerspricht (FAO, 2022). Die Bachforelle als heimische und lokal produzierte Salmonidenart könnte für viele eine attraktive Alternative zu anderen Speisefischen darstellen. Auch die ökologische Produktion von Forellen ist laut EU-Verordnung 710/2009 möglich und eröffnet damit weitere Konsumentenzweige. In Deutschland gibt es Stand 2020 sechs Betriebe, die Forellen nach ökologischen Standards produzieren, und es besteht das Potential für einen Ausbau (BRÄMICK, 2020).

## **2 Das Mikrobiom**

### **2.1 Definitionen**

#### **2.1.1 Mikrobiom und Mikrobiota**

Das Mikrobiom wird von den verschiedenen Autoren wissenschaftlicher Publikationen unterschiedlich definiert (BERG et al., 2020). Nach einer der am häufigsten verwendeten Definitionen umfasst das Mikrobiom die Gesamtheit aller Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen, Viren, Pilzen und Protozoen) der Erde oder, im engeren Sinn, eines definierten Lebensraums, z.B. des Verdauungstrakts des Menschen (PETERSON et al., 2009). Laut Marchesi und Ravel (2015) wird das Mikrobiom weiter gefasst und als der gesamte Lebensraum einschließlich der Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen, niedere und höhere Eukaryoten und Viren), ihrer Genome und der umgebenden Umweltbedingungen definiert. Die Ansammlung von Mikroorganismen, die in einer definierten Umgebung vorkommen, wird abgrenzend dazu als Mikrobiota bezeichnet (MARCHESI & RAVEL, 2015). Ob Viren tatsächlich von der Definition des Mikrobiom erfasst werden, wird von verschiedenen Forschern unterschiedlich bewertet. Da Viren über keinen eigenen Stoffwechsel verfügen und keinen eigenen Replikationsapparat haben, sondern bei der Fortpflanzung auf Wirtszellen angewiesen sind, werden sie von einem Teil der Wissenschaftler nicht als Lebewesen angesehen (DUPRÉ & O'MALLEY, 2009; MOREIRA & LÓPEZ-GARCÍA, 2009). Diese Einordnung ist jedoch nicht unumstritten und andere Autoren wissenschaftlicher Publikationen fordern eine andere Definition für Leben und Lebewesen (FORTERRE, 2010;

HARRIS & HILL, 2021). Neben Viren ist auch der Umgang mit sogenannter „Relikt-DNA“, der freien DNA, die von toten Organismen stammt, umstritten. Die DNA verschwindet nicht zum Zeitpunkt des Todes des Organismus und Teile der Zellen bleiben zusammen mit dem Genom für einen unterschiedlich langen Zeitraum erhalten, bis sie endgültig zersetzt werden (CARINI et al., 2016). Diese freie DNA ist eine Herausforderung in der Mikrobiomforschung, da sie bis zu 80 % der bakteriellen DNA in einer Umweltprobe ausmachen kann (LENNON et al., 2018). Im Gegensatz zum Mikrobiom enthalten die Mikrobiota weder Viren noch freie DNA, da sie nur die lebenden Organismen des Mikrobioms umfassen (BERG et al., 2020). Da die meisten Studien, auf Grund der Vorteile der *16S-rRNA*-Genamplikon-Sequenzierung, sich dieser Methode bedienen (siehe auch Kapitel 3.1), werden die anderen Organismen des Mikrobioms, wie Archaeen, Pilze, Protozoen und Mikroalgen, nicht untersucht. Ihre Wechselwirkungen mit bakteriellen Mikrobiota sind noch weitgehend unerforscht. Studien über das Mycobiom und das Virom (Unterkategorien des Mikrobioms, die sich nur auf Pilze bzw. Viren beziehen) sind selten, besonders für Teleostei (KELLY & SALINAS, 2017) und der Fokus der Mikrobiomforschung liegt fast ausschließlich auf der bakteriellen Gemeinschaft (BG). Das *Earth Microbiome project*, eine Initiative, deren Ziel es ist, eine umfassende Sammlung globaler Mikrobiomproben zusammen zu tragen, wertet beispielsweise Daten von Bakterien, Archaeen und Eukaryoten aus, aber keine Viren (GILBERT et al., 2018).

Ein eukaryotischer Organismus, der sogenannte Wirt bildet zusammen mit den ihn besiedelnden Mikroorganismen den Holobionten (SIMON et al., 2019). Wenn eine sog. Homöostase, also ein Gleichgewicht herrscht, funktionieren das Mikrobiom und der Wirt als eine Einheit von der beide Seiten profitieren (PITA et al., 2018).

### 2.1.2 Kernmikrobiom

Neben den Darstellung der zahlreichen Einflüssen auf das Mikrobiom, gibt es Untersuchungen, dass Fische über ein sog. Kernmikrobiom (engl. *core microbiome*) verfügen, sich also Individuen der gleichen Art einen bestimmten Teil ihrer Bakteriengemeinschaft teilen und ähnliche (Darm-)Bakterien beherbergen (SULLAM et al., 2012). Um herauszufinden, ob Fische über ein Kernmikrobiom verfügen, bedarf es zunächst eine allgemeine Definition des Kernmikrobioms. Für das *Human Microbiome Project* wurde das Kernmikrobiom als eine „Reihe von Genen, die in einem bestimmten Lebensraum bei allen oder der überwiegenden Mehrheit der

Menschen“ vorkommen, definiert (TURNBAUGH et al., 2007). Viele Autoren weichen hiervon jedoch deutlich ab und beziehen sich auf Überschneidungen der Bakteriengemeinschaft von OTUs (Operative Taxonomic Unit; zu Deutsch „operative taxonomische Einheit“) bis zum Phylum. Die taxonomische Ebene ist entscheidend für die Definition, da man auf hohen taxonomischen Ebenen wie Phylum immer ein Kernmikrobiom fände, in Bezug auf zOTUs (Speziesebene) jedoch immer Abweichungen zwischen den Individuen größerer Gruppen bestehen (SHADE & HANDELSMAN, 2012).

Laut der unter Kapitel 2.1.1 gewählten Definition des Mikrobioms müssten Untersuchungen des Kernmikrobioms sich nicht nur mit den Mikroorganismen in einem bestimmten Habitat, wie z.B. dem Darm befassen, sondern beispielweise auch die abiotischen Faktoren berücksichtigen. Bei den meisten Studien sind jedoch nur die Mikrobiota das Forschungsziel und es wird dennoch vom Kernmikrobiom gesprochen (NEU et al., 2021). Da der überwiegende Teil der Veröffentlichungen dieser Definition folgt, werden in dieser Arbeit die Begriffe Kernmikrobiom und Kernmikrobiota ebenfalls synonym verwendet.

Neben der taxonomischen Ebene gibt es weitere Kriterien für die Beschreibung eines Kernmikrobioms. Während viele Autoren nur das Vorhandensein von z.B. OTUs vergleichen, schlagen andere Autoren Alternativen dazu vor. Neben dem reinen Nachweis des Vorkommens könnten auch die Abundanz des Organismus in der Gesamtprobe verglichen oder das konstante Vorkommen über einen längeren Zeitraum berücksichtigt werden (SHADE & HANDELSMAN, 2012). Andere Autoren hingegen argumentieren, dass ein rein taxonomischer Ansatz nicht sinnvoll sei, sondern der größere Fokus auf der Funktion der Mikroorganismen als Teil des Holobionten liegen sollte, und somit *functional core microbiota* Ziel der Forschung sein sollten (LEMANCEAU et al., 2017). Die unterschiedlichen Definitionen machen die Beantwortung der Frage nach der Existenz eines Kernmikrobioms schwierig.

WONG et al. (2013) beschreiben für die zur gleichen Unterfamilie (Salmoninae) wie die Bachforelle gehörende Regenbogenforelle, ein stabiles Kernmikrobiom, das auch externen Einflussfaktoren wie beispielsweise Änderungen in der Futterzusammensetzung widersteht. Eine andere Studie an 15 verschiedenen Fischarten zeigte jedoch artspezifische Unterschiede im Hinblick auf die Frage, ob ein Kern-

mikrobiom existiert. Für manche der untersuchten Arten konnte ein Kernmikrobiom beschrieben werden, während andere Arten große intraspezifische Unterschiede zeigten. In der gleichen Studie konnte auch eine Reihe von OTUs festgestellt werden, die bei verschiedenen Fischarten im Darm gefunden wurden und möglicherweise eine wichtige Funktion bei der Verdauung und der Immunabwehr erfüllen. Die drei in der Studie untersuchten Haispezies teilten sich ein Kernmikrobiom, das aus drei OTUs *Cetobacterium* sp., *Photobacterium* sp. und *Vibrio* sp. bestand (GIVENS et al., 2015). Die Definition, ab wie vielen Vertretern einer taxonomischen Einheit man von einem Kernmikrobiom spricht, ist ebenso nicht einheitlich wie die Frage, ob alle Individuen des Wirts von dem Mikroorganismus oder der Mikroorganismengruppe besiedelt werden müssen, oder ob z.B. 80 % der untersuchten Individuen ausreichen (GAJARDO et al., 2016). In manchen Studien werden bereits drei oder vier OTUs, die in den meisten Fischen vorkamen, als Kernmikrobiom bezeichnet, während andere Autoren 19 OTUs über alle beprobten Fische hinweg feststellen konnten (DEHLER et al., 2017; RUDI et al., 2018). Ein wichtiger Faktor bei der Beurteilung, ob ein Kernmikrobiom vorliegt sind die Methodik bzw. die gewählten Parameter. Je strenger selten vorkommende OTUs über Filter aussortiert werden, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Kernmikrobiom über alle untersuchten Wirte gefunden wird.

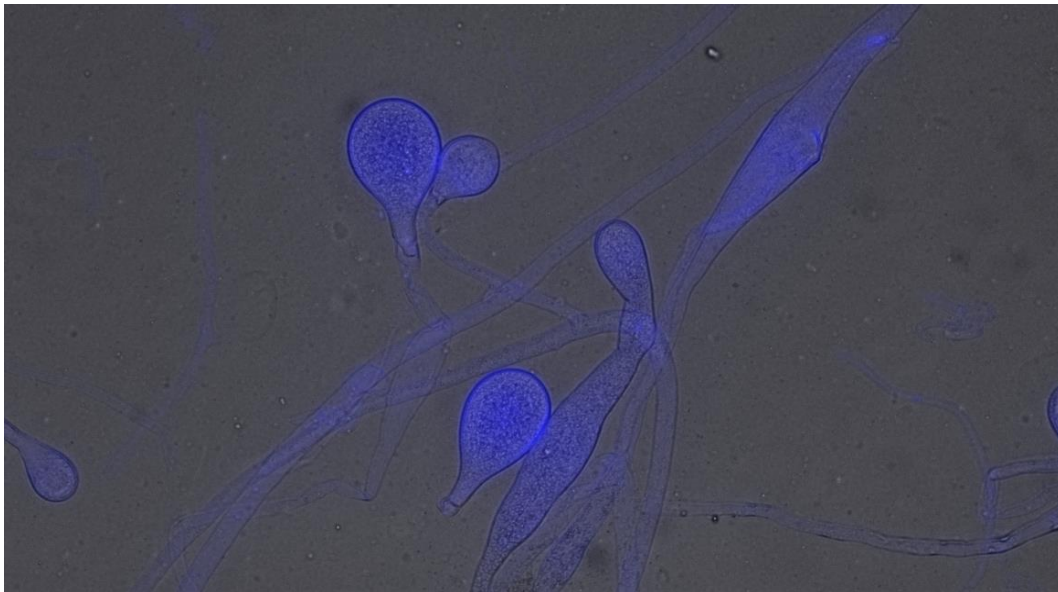
Neben dem Kernmikrobiom postulieren SULLAM et al. (2012), dass der Großteil der Bakterien im Fischdarm große Ähnlichkeiten mit der Bakteriengemeinschaft im Darm von anderen Wirbeltieren und Wirbellosen hat. Nur einige haben die größte Übereinstimmung mit Umweltbakterien. Es wird angenommen, dass die meisten Darmbakterien an den Wirt angepasst sind und in Form einer Symbiose mit diesem zusammen existieren. Während man in der Vergangenheit eher gegenseitige Beziehungen zwischen zwei interagierenden Organismen untersucht hat, sieht man die Mikrobiota und ihr Verhältnis zum Wirt heute eher als Netzwerk (BOUTIN et al., 2013). Am besten untersucht, auch hinsichtlich des Kernmikrobioms, sind die Darmmikrobiota von Fischen und ihre Funktion für bzw. ihr Einfluss auf den Wirt. Unterschiedliche Körperregionen wie z.B. Darm und Haut zeigen jedoch, ähnlich wie bei Säugetieren, sehr verschiedene Mikrobiotazusammensetzungen (LOWREY et al., 2015; WEBSTER et al., 2018; MENG et al., 2021) und müssen daher grundsätzlich differenziert betrachtet werden. Diese differenzierte Betrachtung ist bei

Studien zu Fischen während der Ontogenese jedoch nicht möglich, da eine Beprobung *in toto* erforderlich ist, um einen Vergleich über die verschiedenen Entwicklungsstadien überhaupt erst zu ermöglichen. ZHANG et al. (2020) jedoch fanden laut eigener Definition ein stabiles Kernmikrobiom beim Steinbutt (*Scophthalmus maximus*) trotz einer unterschiedlichen Beprobung der Eier (*in toto*) und der Fische nach dem Schlupf (nur Darm). Auffällig ist hierbei das Bakterium *Lactococcus piscium*, welches in allen Entwicklungsstadien auftrat und unter den fünf häufigsten Bakterienarten einen relativen Anteil von 12-60% im Darm und 10-35% bei den Eiern aufwies. Da es abgesehen von diesem Bakterium deutliche Unterschiede zwischen den beiden Fischfarmen gab, in denen der Versuch stattfand, ist unklar, ob hierbei bereits von einem Kernmikrobiom gesprochen werden kann.

In einer Studie mit Goldbrassen (*Sparus aurata*), in der ähnlich wie in der vorliegenden Studie, die Fische vom Ei bis zur Brut *in toto* beprobt wurden, fanden die Autoren zehn OTUs, die in allen Entwicklungsstadien vertreten waren. Von den Autoren wird nicht angegeben, ob diese OTUs in allen Fischen gefunden wurden (NIKOULI et al., 2019).

## 2.2 Einfluss der Mikrobiota auf den Wirtsfisch

Das Mikrobiom und die Mikrobiota darin sind essentiell für die Immunabwehr und die Gesundheit von Wirbeltieren (MCFALL-NGAI et al., 2013; FOSTER et al., 2017). Der Fokus der Erforschung des Mikrobioms und seiner Mikrobiota konzentriert sich auf Menschen und Mäuse; daher steht die Erforschung des Mikrobioms von Fischen noch am Anfang. Die existierenden Studien zeigen, dass ein funktionierendes Mikrobiom für die Gesundheit des Wirtsfisches ebenso essentiell ist wie für andere Organismen (LLEWELLYN et al., 2014). Im Vergleich zu terrestrischen Organismen sind aquatische Lebewesen wie Fische viel unmittelbarer mit dem umgebenden Medium und den im Wasser vorkommenden Mikroorganismen konfrontiert (LEGRAND et al., 2018). Das Wasser, in dem die Fische leben, ist auch der Lebensraum für eine Gemeinschaft an Organismen, zu denen Viren, Bakterien oder Eukaryoten zählen können und die neben Einzellern auch Mehrzeller umfasst und deren Zusammensetzung sich deutlich von der in terrestrischen Habitaten unterscheidet (HAHN, 2006).



**Abbildung 4: Hyphen und Oogonien von *Saprolegnia* sp. von der Oberfläche einer beprobten Bachforelle**

Zu den im Wasser vorkommenden Mikrobiota gehören auch pathogene oder fakultativ pathogene Organismen. Ein Beispiel ist *Saprolegnia* spp., ein saprophytischer Oomycet (s. Abbildung 4), der ubiquitär vorkommt und von totem organischen Material lebt, aber auch auf geschwächten oder erkrankten Fischen parasitiert (MAGRAY et al., 2021). Viele Bakterienarten wie z.B. die Gattungen *Vibrio* oder *Pseudomonas* gehören ebenfalls zu den fakultativen Fischpathogenen, die nur dann eine Krankheit auslösen, wenn der befallene Organismus geschwächt ist (LIM & WEBSTER, 2001; BRIEDE, 2010).

Um sich vor Pathogenen zu schützen, hat der Fisch ein komplexes System an angeborenen Abwehrmechanismen. Teil dieser Schutzmechanismen ist unspezifisch und damit bei poikilothermen (also wechselwarmen) Organismen besonders wichtig, da die spezifische Immunabwehr von der Umgebungstemperatur abhängig ist (ELLIS, 2001). Neben der fischeigenen Immunabwehr spielt auch das Mikrobiom eine entscheidende Rolle bei der Abwehr gegen Pathogene. Die Schleimhaut der Fische stellt einen wichtigen Teil des Immunsystems dar, da sie die erste Barriere gegen Pathogene im umgebenden Medium ist (PEATMAN et al., 2015). Teil der Immunabwehr sind die Mikrobiota, die die Schleimhaut der Fische besiedeln (HU et al., 2021; CÁMARA-RUIZ et al., 2022).

Doch nicht nur die Mikrobiota der Schleimhaut sind ein wichtiger Teil der Immunabwehr, sondern auch die Mikroorganismen, die einen anderen Teil des Fisches wie

z.B. die Kiemen oder den Gastrointestinaltrakt (GIT) besiedeln. Während manche Milchsäurebakterien wie z.B. bestimmte Stämme der Gattung *Streptococcus* selber fischpathogen sind, können andere Arten das Immunsystem des Fisches stimulieren und nützliche Effekte auf die Fischgesundheit haben (VÁZQUEZ et al., 2005; GATESOUBE, 2008). Einige Darmbakterien, die aus Fischen isoliert wurden, haben die Fähigkeit, antibakterielle Stoffe zu bilden und das Wachstum anderer Bakterien, z.B. Pathogenen, zu inhibieren (SUGITA et al., 1998). Kommensale Bakterien können zudem eine Besiedlung durch Pathogene indirekt durch eine Schaffung von Konkurrenz um Mikronährstoffe wie z.B. Eisen oder zu besiedelnde Oberflächen wie z.B. die Schleimhäute behindern (GRAM et al., 1999; CHABRILLÓN et al., 2005). Neben der Immunabwehr sind Bakterien auch in Hinblick auf die Verwertung und Verdauung von Nahrung und der Aufnahme von Nährstoffen von essentieller Bedeutung für den Fisch (IZVEKOVA, 2005; SAHA et al., 2006; TALWAR et al., 2018)

### **2.3 Einflüsse auf das Mikrobiom**

Das Darmmikrobiom wird durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst, unter anderem durch jahreszeitliche Schwankungen (HOVDA et al., 2012), Stress (OLSEN et al., 2005), tageszeitliche Variationen (SUGITA et al., 1990), Entwicklungsstadien (BURGOS et al., 2018), Migration zwischen Süß- und Salzwasser (DULSKI et al., 2020b), Wasserqualität (FOYSAL et al., 2020) und die Phylogenie des Wirts (SULLAM et al., 2012; STAR et al., 2013).

Die Vielzahl an äußeren Einflüssen macht die Erforschung des Mikrobioms so komplex, denn verschiedene Einflüsse können sich gegenseitig verstärken oder aufheben. Änderungen des Mikrobioms durch äußere Einflüsse haben meist direkte oder indirekte Folgen für den Wirt.

#### **2.3.1 Futter**

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts konnte in Studien gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des Futters Einfluss auf die im Darm lebenden Mikroorganismen hat (HERTER & KENDALL, 1910). Durch die wachsende Nachfrage nach tierischen Proteinen, sowie den starken Rückgang der natürlichen Fischbestände in den letzten Jahrzehnten und das damit verbundene Wachstum der Aquakultur weltweit, besteht ein großes wirtschaftliches Interesse an einer bestmöglichen Fütterung (FAO, 2022). Die Fische sollen nicht nur möglichst schnell bei einem möglichst

guten Futterquotienten wachsen, sie sollen auch gesund, robust und wenig anfällig gegenüber Krankheiten sein. Gleichzeitig gewinnt eine nachhaltige Produktion an Bedeutung. Neben anderen Bestandteilen enthält das Fischfutter für karnivore Arten Fischmehl und Fischöl. Der Großteil des Ausgangsmaterials für Fischmehl (ca. 25%) stammt aus der Fischerei, während der verbleibende Anteil bei der Verarbeitung von Fisch für den menschlichen Verzehr entsteht (JACKSON, 2009). Dieser Umweg als Futter von attraktiveren Speisefischen, statt einer direkten Nutzung der natürlichen tierischen Proteinquelle ist weder ökologisch noch ökonomisch nachhaltig. Dies ist von besonderer Wichtigkeit, da zum einen der Sojapreis im Vergleich zu Fischmehl deutlich niedriger liegt und in den letzten Jahrzehnten einen geringen Anstieg verzeichnete und zum anderen die natürlichen Fischbestände rückläufig sind (OLSEN & HASAN, 2012; FAO, 2022). In verschiedenen Studien wurden Salmoniden mit rein pflanzlichem Futter gefüttert. Die Ergebnisse zeigen, dass Salmoniden pflanzlich ernährt werden können. Besonders die frühe Anfütterung mit rein pflanzlicher Nahrung zeigt, dass grundsätzlich eine rein pflanzliche Ernährung möglich ist (GEURDEN et al., 2013). Während Rudi et al (2018) bei Lachsen (*Salmo salar*) nur einen geringen Unterschied in der Mikrobiotazusammensetzung zwischen den Gruppen fanden, denen eine pflanzenöl- oder eine fischöhlhaltige Diät gefüttert wurde, stellten andere Autoren eine deutliche Verschiebung der Bakteriengemeinschaft fest (RUDI et al., 2018). Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), die mit einer pflanzlichen Diät gefüttert wurden, zeigten eine höhere Abundanz von Bacillota (ehemals Firmicutes) und eine geringere bei Proteobakterien (DESAI et al., 2012). Michl et al. (2019) konnten für Bachforellen ebenfalls eine Zunahme von Bacillota und Bacteroidetes bei einer Diät mit pflanzlichem Protein feststellen (MICHL et al., 2019). Bei einem Versuch mit jungen Regenbogenforellen, bei dem die Reaktion der Mikrobiota nach der Anfütterung untersucht wurden, war die Abundanz von Bacillota jedoch signifikant höher bei der pflanzlichen Diät (MICHL et al., 2017). Es bedarf daher weiterer Forschung, um herauszufinden welchen Einfluss der Einsatz von pflanzlichen Proteinquellen auf das Mikrobiom von karnivoren Fischen hat und ob diese Veränderungen artspezifisch hat.

### 2.3.2 Äußere Einflüsse

In der klassischen Untersuchung von Oberflächengewässern werden die physikalischen Parameter O<sub>2</sub>, pH, Leitfähigkeit und Temperatur erfasst. Diese Faktoren haben alle einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Mikroorganismen, die im



Wasser, auf den abiotischen Oberflächen im Wasser oder in oder auf den im Wasser lebenden Pflanzen und Tieren vorkommen. Fische sind Zeit ihres Lebens von Wasser umgeben und dadurch stark von den physikalischen Parametern des umgebenden Mediums abhängig.

Untersuchungen in anderen Systemen als dem Holobionten, wie z.B. den Bakteriengemeinschaften in Böden, zeigen einen starken Einfluss des pH-Werts auf das Mikrobiom. Unterschiede zwischen verschiedenen Bodentypen sind signifikant hinsichtlich der unterschiedlichen pH-Werte (FIERER & JACKSON, 2006; CHU et al., 2010). Um die Auswirkung von Gewässerversauerung z.B. durch sauren Regen zu simulieren, wurden Schwarze Pacus (*Colossoma macropomum*) allmählich an niedrigere pH-Werte von bis zu pH 4,0 angepasst. Während sich die Mikrobiota der Schleimhaut hinsichtlich ihrer Zusammensetzung stark veränderte, zeigten die Darmmikrobiota eine ausgesprochene Resilienz, so dass sich die Veränderung der Bakterienzusammensetzung wieder rückläufig zum Ausgangszustand hin entwickelte (SYLVAIN et al., 2016). Da während der Passage des Magen-Darm-Trakts (Gastrointestinaltrakt, GIT) niedrige pH-Werte nicht außergewöhnlich sind, ist das Darmmikrobiom anscheinend gut genug gepuffert und nur der durch den niedrigen pH-Wert ausgelöste Stress hat zu der vorübergehenden Verschiebung der Mikrobiotazusammensetzung geführt (SYLVAIN et al., 2016). Säuretolerante Bakterien gehören laut Nayak zu einer Gruppe, die sich nur auf Grund besagter Eigenschaft im GIT ansiedeln kann (NAYAK, 2010).

Wie ihre Wirtsorganismen, die poikilothermen Fische, sind auch Bakterien als ebenfalls ektotherme Organismen in ihrem Wachstum stark von der Temperatur abhängig und haben einen spezifischen, optimalen Temperaturbereich (CLARKE & FRASER, 2004; CORKREY et al., 2012). Bei höheren Wassertemperaturen zeigten Eier von Bachforellen eine höhere Diversität der auf ihnen lebenden Bakterien (WILKINS et al., 2015). In der gleichen Untersuchung wurden keine Unterschiede von verschiedenen Standorten innerhalb des gleichen Flusssystemes gefunden. Bei höheren Temperaturen wurde neben vielen ubiquitär vorkommenden Süßwasserbakterien eine Reihe obligat oder fakultativ pathogener Arten gefunden. Neben z.B. *Pseudomonas fluorescens*, einer fakultativ pathogenen Art, wurde auch eine höhere Abundanz von *Flavobacterium psychrophilum* festgestellt, ein fischpathogenes Bakterium, das bei adulten Salmoniden die Kaltwasserkrankheit (engl. *bacterial cold water disease*) auslöst (AUSTIN et al., 2007; WILKINS et al., 2015).

Auch Neuman *et al.* fanden einen Anstieg der Anzahl der Bakterienarten bei höheren Temperaturen. Gleichzeitig wurden die Unterschiede der Bakterienzusammensetzung, die zwei Gruppen Fische besiedelten, denen unterschiedliche Diäten gefüttert wurden, bei zunehmenden Temperaturen größer (NEUMAN *et al.*, 2016). Bei hohen Temperaturen nimmt die Stoffwechselrate von Fischen zu. Dies zeigt sich auch bei der sogenannten „Magenentleerungsrate“ (engl. „*gastric evacuation rate*“), die bei höheren Temperaturen ansteigt, wobei bei der entsprechenden Studie die Fische ihr tolerables Temperaturmaximum nie erreichten (KAWAGUCHI *et al.*, 2007). Eine schnellere Magenentleerungsrate bedeutet einen höheren Futterumsatz, was wiederum einen Einfluss auf die Mikrobiontazusammensetzung im Darm haben könnte.

Wassertemperaturen sind nicht nur in unterschiedlichen Gewässern in verschiedenen Höhen (Meereshöhe) und Breitengraden unterschiedlich, sie sind auch saisonalen Schwankungen während des Jahres unterworfen. Folglich zeigen sich im jahreszeitlichen Verlauf Unterschiede des Mikrobioms. Untersuchungen des Inhalts des Hinterdarms von Fischen zeigten starke jahreszeitliche Schwankungen, die von den Autoren auf die Temperaturunterschiede zurück geführt wurden (ZARKASI *et al.*, 2014). Dulski *et al.* (2020a) fanden saisonale Abweichungen; diese waren jedoch weniger ausgeprägt, als beispielsweise der Einfluss des Habitats (DULSKI *et al.*, 2020a). Besonders die Mikrobiota der Fischschleimhaut und der Kiemen sind stark von der Wassertemperatur abhängig (ROSADO *et al.*, 2021).

Element *et al.* (2020) beschreiben ebenfalls saisonale Unterschiede, führt diese jedoch nicht auf die Temperatur zurück, sondern auf die unterschiedlichen von der Jahreszeit abhängigen Habitate, die sich unter anderem hinsichtlich des Salzgehaltes im Wasser unterscheiden (ELEMENT *et al.*, 2020). Die Salinität beeinflusst die Mikrobiotazusammensetzung ebenso wie der pH-Wert und die Wassertemperatur.

Sullam *et al.* (2012) konnten Unterschiede zwischen der Mikrobiontazusammensetzung zwischen Süß- und Salzwasserfischen feststellen, wobei *Aeromonas* spp. und *Plesiomonas* spp. (Gammaproteobakterien) vermehrt bei Süßwasserfischen vorkommen und *Vibrio*-Arten eine größere Abundanz bei Salzwasserfischen zeigt (SULLAM *et al.*, 2012).

In einer Studie mit Hechten (*Esox lucius*) konnten bei verschiedenen Salinitäten nach zehn Tagen keine signifikanten Unterschiede der Häufigkeiten der verschiedenen Bakterientaxa festgestellt werden. Die Fische, die bei einem Salzgehalt von

7‰ gehalten wurden, zeigten jedoch signifikant höhere Mortalitäten als die Versuchsfische in Frischwasser und die Gruppe, die in einem 3‰ Salzgehalt in Wasser gehalten wurden (DULSKI et al., 2020b).

Element *et al.* (2020) beschreiben als größten Antrieb für Veränderungen der Mikrobiotazusammensetzung beim Seesaibling (*Salvelinus alpinus*) die Wassertemperatur und das Wanderverhalten zwischen Süß- und Salzwasser (ELEMENT et al., 2020). Beim Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) konnte beim Wechsel von Süß- ins Salzwasser eine 100-fache Zunahme der Darmmikrobiota festgestellt werden (RUDI et al., 2018). Es ist denkbar, dass diadrome Fische als Arten, die natürlicherweise mindestens einmal in ihrem Leben zwischen Salz- und Süßwasser wandern, eine stärkere Anpassung ihres Mikrobioms erfahren.

### 2.3.3 Fischhaltung in der Aquakultur

Der Einfluss der Haltung in der Aquakultur auf das Mikrobiom der Fische ist komplex. Neben Faktoren wie Futter oder Haltungsdichte gibt es auch indirekte negative Faktoren, die durch die Haltungsbedingungen begünstigt werden, z.B. höhere Konzentration von Pathogenen im umgebenden Wasser (siehe auch Kapitel 2.3.1 und Kapitel 2.3.4). Lachse (*Salmo salar*) aus zwei verschiedenen freien Gewässern, sowie Lachse, die von Individuen aus der Population der beiden Gewässer abstammen, aber in einer Fischzucht aufwachsen konnten, wurden hinsichtlich ihrer Mikroorganismen untersucht. Die Fische zeigten signifikante Unterschiede in der Mikrobiotazusammensetzung zwischen Individuen, die aus dem Gewässer oder aus der Fischzucht stammten, was die Forscher auf den Einfluss der Haltung zurückführten. Ein besonders hervorgehobener Aspekt ist der Unterschied zwischen Naturnahrung und industriellem Futter (LAVOIE et al., 2018). Aufgrund der nahen Verwandtschaft zwischen Lachs und Bachforelle ist davon auszugehen, dass diese Einflüsse und daraus resultierenden Veränderungen auch für die Bachforelle zutreffen könnten. Auch bei anderen Fischarten konnte der Einfluss der Fütterung auf das Mikrobiom bereits beschrieben werden. Wong *et al.* (2015) konnten zeigen, dass Änderungen der Fütterung von Zebraabrärlingen zu Änderungen im Mikrobiom des Wassers führen (WONG et al., 2015), was wiederum Einfluss auf die darin lebenden Fische hat. Gleichzeitig spielen veränderte Umweltfaktoren wie abiotische Parameter (siehe auch Kapitel 2.3.2) eine Rolle. Die medikamentöse Behandlung in der Fischhaltung sowie die vorbeugende Behandlung verändert das Mikrobiom der Fische ebenfalls (siehe

auch 2.3.5).

Einen direkten Einfluss auf das Mikrobiom hat die Besatzdichte in den Teichen und Becken (BROWN *et al.*, 2019). Neben hohen Besatzdichten (ELLIS *et al.*, 2002) sind die Haltung in der Aquakultur an sich und das Hantieren mit den Fische (DAVIS & SCHRECK, 1997) Stressfaktoren. Stress hat eine Veränderung der Mikrobiotazusammensetzung zur Folge und ermöglicht es Pathogenen, sich durchzusetzen (BOUTIN *et al.*, 2013). Minniti *et al.* stellten fest, dass sich nach dem Hantieren mit den Fische die Bakteriengemeinschaft deutlich veränderte und besonders *Burkholderia* spp., – eine Gattung, zu der einige Krankheitserreger gehören, jedoch keine fischpathogenen Vertreter bekannt sind – 24 Stunden später in deutlich höherer Zahl vorkam (MINNITI *et al.*, 2017). Weitere Stressfaktoren können unter anderem hohe Wassertemperaturen (CHERRY *et al.*, 1977), geringer Sauerstoffgehalt sowie hohe Gasübersättigung (siehe Abbildung 5); (COLT & WESTERS, 1982) oder hohe Ammoniumkonzentration (LIN & WU, 1996) sein.



**Abbildung 5: Bachforelle aus der Aquakultur**

Auf Grund einer zu hohen Gasübersättigung hat der Fisch ein Auge verloren.

Bakterien profitieren generell von hohen Nährstoffkonzentrationen. Besonders wenn neben einer hohen Nährstoffverfügbarkeit hohe Wassertemperaturen herrschen, nimmt die Bakterienkonzentration im Wasser der Teichwirtschaft zu (POMEROY & WIEBE, 2001). Da manche Bakterientaxa von einer Eutrophierung (Anreicherung von Nährstoffen) und hohen Temperaturen stärker profitieren als andere, kommt es zu einer Änderung des Teichmikrobioms (WATSON *et al.*, 1997; JOEHNK *et al.*, 2008), was den Fisch und sein Mikrobiom beeinflusst (GALLET

et al., 2021). Eine erhöhte Zufuhr von Nährstoffen verändert nicht nur die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft, sondern sorgt auch für eine höhere Mortalität von Bachforelleneiern (WILKINS et al., 2016). Eine Studie an Renkeneiern (*Coregonus suidteri*) konnte ebenfalls höhere Mortalitätsraten sowie eine höhere Bakteriendichte dokumentieren. Die Autoren schlossen daraus, dass bei einer höheren Nährstoffversorgung fakultative Krankheitserreger zu Pathogenen werden können (WEDEKIND et al., 2010). Auch die Verhaltensänderung der Fische, z.B. verändertes Fressverhalten bei hohen Wassertemperaturen, hat einen indirekten Einfluss auf das Darmmikrobiom (FONDS et al., 1992). Vergleichende Untersuchungen von Fischen derselben Spezies aus Aquakulturzucht und Wildfischen bestätigen Unterschiede des Mikrobioms, die zumindest zum Teil auf die bereits genannten Faktoren zurückzuführen sind (RAMÍREZ & ROMERO, 2017a, 2017b; WEBSTER et al., 2018).

#### 2.3.4 Krankheiten

Veränderungen des Mikrobioms können die Anfälligkeit des Wirtsfisches für Krankheiten erhöhen. Gleichzeitig verändert auch das Auftreten von Krankheiten die Zusammensetzung der Mikrobiota und kann zu einer Dysbiose führen. Die Konfrontation mit Krankheitserregern kann das Mikrobiom so verändern, dass pathogene und fakultativ pathogene Mikroorganismen sich vermehren und zu einer Superinfektion führen können (NUSBAUM & MORRISON, 2002; CRUMLISH et al., 2010). Die meisten Studien untersuchten bisher nur die Auswirkungen der Mikrobiota bei der Infektion mit einem einzelnen Pathogen.

Lachse (*Salmo salar*), die im Rahmen eines Experiments mit dem Ektoparasiten Lachslaus (*Lepeophtheirus salmonis*) infiziert wurden, wiesen einen geringeren Bakterienreichtum in ihrem Schleimhautmikrobiom auf (LLEWELLYN et al., 2017). Beim Auftreten der sog. „red-operculum“-Krankheit, einer Hämorrhagischen Septikämie, deren Auslöser unbekannt ist, zeigten die erkrankten Fische eine Störung der Darmbakterien, bei der bestimmte Bakterientaxa eine deutlich höhere Organismenanzahl aufwiesen als in gesunden Fischen (LI et al., 2017). Auch LEGRAND *et al.* (2018) stellten im frühen Stadium einer lymphozytischen Enteritis eine Abnahme der Bakteriendiversität und eine veränderte Mikrobiotazusammensetzung fest. Die Bakteriengemeinschaften in unterschiedlichen Körperbereichen wie z.B. Verdauungstrakt und Fischoberfläche unterscheiden sich, da sie un-

terschiedlichen Zwecken dienen. Dennoch können Erkrankungen, die das Verdauungssystem betreffen, auch die Gemeinschaft der Mikrobiota der Schleimhaut verändern. Im späteren Stadium der Krankheit glich sich die Bakterienzusammensetzung wieder der von gesunden Fischen an (LEGRAND et al., 2018). Während Untersuchungen einer chinesischen Gründlingsart (*Coreius guichenoti*) ebenfalls eine geringe Diversität der Bakteriengemeinschaft bei mit *Aeromonas salmonicida* infizierten Tieren fanden, einem fischpathogenen Bakterium, das Auslöser der Furunkulose ist, konnte dies nicht für alle Pathogene und Fischarten bestätigt werden (LI et al., 2016). Bachforellen, die mit dem Parasiten *Tetracapsuloides bryosalmonae* infiziert waren, der zu den Nesseltieren gehört und Erreger der Proliferativen Nierenkrankheit der Fische ist, zeigten zwar ebenfalls eine Dysbiose der Bakteriengemeinschaft, jedoch im Gegensatz zum erwarteten Ergebnis eine höhere Diversität als gesunder Tiere, gemessen an der untersuchten und bestimmten  $\alpha$ -Diversität (Anzahl OTUs; VASEMÄGI et al., 2017). Bei einer Infektion von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit der Ichthyophthiriose, verursacht durch das Wimperntierchen *Ichthyophthirius multifiliis*, einer der bedeutendsten Parasitosen bei Süßwasserfischen, war neben der Dysbiose der Mikrobiota ebenfalls eine höhere Diversität als in der Kontrollgruppe feststellbar (ZHANG et al., 2018). Ebenso wie ZHANG et al. (2018) für die Bachforellen, stellten MENG et al. (2021) bei Karpfen mit der Frühlingsvirämie, verursacht durch *Rhabdovirus carpio*, eine Abnahme der Anzahl an kommensalen Bakterien sowie eine Zunahme von Opportunisten fest. Es besteht weiterer Forschungsbedarf inwieweit diese Erkenntnisse tatsächlich widersprüchlich sind, oder verschiedene Erreger bei verschiedenen Wirtfischen unterschiedliche Reaktionen hinsichtlich der Veränderungen der Bakteriengemeinschaft verursachen.

### 2.3.5 Medikamente, Probiotika und Präbiotika

Eine der größten Bedrohungen für die Aquakultur sind Krankheiten (HEMMINGSTEN & MARTINS, 2008). Durch die Bedingungen in der Fischzucht werden Krankheiten gefördert und der Einsatz von Medikamenten ist essentiell, um Einbußen bis hin zum Totalverlust des gesamten Bestands zu verhindern. Der intensive Einsatz von Antibiotika zur Bekämpfung bakterieller Infektionen hat jedoch zu einer Zunahme von Resistenzen der Bakterien geführt (SØRUM, 2005; SAPKOTA et al., 2008; DEFOIRDT et al., 2011). Zusätzlich gelangen Antibiotika und andere Antiinfektiva wie antimikrobielle und antifugale Substanzen durch die

Landwirtschaft und Abwässer in natürliche Gewässer und können in der unmittelbaren Umwelt ebenfalls Resistenzen bei Teilen der Mikrobiotagemeinschaft fördern (SEGURA et al., 2009). Gleichzeitig bedeutet der Einsatz von Antibiotika und anderen Medikamenten immer eine Beeinträchtigung mehrerer oder aller Bakterienarten. Die Gabe von Antibiotika führt somit zu einer Dysbiose und schwächt das Immunsystem des Wirts (LANGDON et al., 2016). Im Versuchsmodell Fisch konnte ein negativer Effekt bereits nachgewiesen werden: Koboldkärpflinge (*Gambusia affinis*) zeigten nach einer Behandlung mit Antibiotika nicht nur eine Verschiebung der Mikrobiotazusammensetzung und einen Rückgang der Bakteriendiversität, sondern auch eine höhere Anfälligkeit für Pathogene (CARLSON et al., 2015). Bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) konnte nicht nur gezeigt werden, dass die nützlichen Mikrobiota nach einer Behandlung mit Oxytetracyclin abnahmen, sondern auch dass die Änderungen innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft noch 14 Tage nach Absetzen des Antibiotikums andauerten (PAYNE et al., 2022). Dysbiose tritt nicht nur bei der Behandlung mit Antibiotika auf; auch der Einsatz von anderen Therapeutika z.B. Kaliumpermanganat, einem in der Aquakultur häufig eingesetztem Desinfektionsmittel, kann die kommensalen Mikroorganismen schwächen (MOHAMMED & ARIAS, 2015). Alternative Behandlungen bzw. Prophylaxe sind daher angezeigt.

Ziel der Aquakultur sind gesunde, schnell wachsende Tiere. Um eine hohe Resilienz gegen Pathogene und einen idealen Stoffwechsel zu gewährleisten, sind neben dem Futter andere Methoden in den Fokus der Wissenschaft gerückt, die sich der gezielten Manipulation des Darmmikrobioms durch die Verabreichung von probiotischen und präbiotischen Präparaten widmet. Ziel ist die Entwicklung einer Strategie, wie die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft möglichst optimal beeinflusst werden kann, und für den Fisch nützliche Mikrobiota gefördert werden können. Probiotika sind Futterergänzungen, die lebensfähige Mikroorganismen enthalten, die sich im Verdauungstrakt ansiedeln sollen. Präbiotika sind Futterbestandteile, die das Wachstum bestimmter nützlicher Bakterien im Darm fördern.

Die Untersuchungen von Pro- und Präbiotika sind schwierig, da *in-vitro*-Ergebnisse nicht zwangsläufig auf *in vivo* übertragbar sind. Der *Pseudomonas-fluorescens*-Stamm AH2, zeigte *in vitro* eine stark hemmende Wirkung gegenüber *Aeromonas salmonicida*, den Auslöser von Furunkulose bei Salmoniden, änderte *in vivo* jedoch nicht die Pathogenität des Krankheitserregers oder die Mortalität nach Ausbruch

der Krankheit (GRAM et al., 2001). Eine ganze Reihe von Bakteriengattungen wurde hinsichtlich ihrer Eignung als Probiotika untersucht: u.a. *Aeromonas* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. und *Vibrio* spp. (MERRIFIELD et al., 2010). *Bacillus* spp. wurde beispielsweise bei Regenbogenforellen (*Onchorhynchus mykiss*) dem Futter als Probiotikum während der ersten zwei Monate des Anfütterns zugefügt und führten zu erhöhten Überlebens- und Zuwachsraten (BAGHERI et al., 2008); HINES et al. (2022) konnten für *Bacillus subtilis* nicht nur bestätigen, dass es den Gesundheitszustand verbesserte und zu besseren Wachstumsraten führt. Die Autoren stellten zudem fest, dass das Probiotikum nur positive Effekte erzielte, wenn es am Anfang der Entwicklung des Darms verabreicht wurde. GHOSH et al. (2008) konnten ähnliches für den Einsatz von *Bacillus subtilis* bei verschiedenen Zierfischen zeigen. Neben verbesserten Wachstumsparametern verbesserte *Bacillus subtilis* auch die Krankheitsresistenz gegen *Aeromonas hydrophila*, einem Fischpathogen. Das Probiotikum *Lactobacillus rhamnosus* wurde in einer Studie erfolgreich eingesetzt, um die negativen Folgen einer Exposition von Perfluorbutansulfonsäure auf das Schleimhautmikrobiom von Zebraäbrlingen (*Danio rerio*) abzuschwächen (HU et al., 2021). Die Effekte des Einsatzes von Probiotika müssen jedoch nicht von Dauer sein, sondern können nachlassen, sobald das Probiotikum dem Fisch nicht länger über das Futter zugeführt wird (PANIGRAHI et al., 2005). Neben dem Einsatz von einzelnen Bakteriengattungen und -arten wird auch untersucht, ob eine Kombination aus verschiedenen Bakterienarten einen präferablen Effekt hat. Ramos et al. konnten bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) für eine Kombination aus verschiedenen Probiotika (A: *Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp.) eine höhere *Richness* (= Bakterienvielfalt als Zahl der vorkommenden Arten; siehe auch 3.3.1) als bei der Zugabe von *Pediococcus acidilactici* allein feststellen (RAMOS et al., 2013). Der Einsatz höherer Konzentrationen des jeweiligen Probiotikums führt nicht grundsätzlich zu einer Zunahme der positiven Effekte, daher empfehlen die Autoren entsprechender Studien einen sparsamen Einsatz (BAGHERI et al., 2008; GHOSH et al., 2008).

Neben dem Einsatz von lebenden Mikroorganismen gibt es auch die Möglichkeit, über Präbiotika die Mikroorganismen zu fördern, deren Vorkommen die Gesundheit des Wirts verbessern können. Neben den Studien zu der Wirkung der genannten Präbiotika bei Fischen besonders von Oligosacchariden (STAYKOV et al., 2007;



DIMITROGLOU et al., 2010) und Inulin (REFSTIE et al., 2006; BAKKE-MCKELLEP et al., 2007) wurde auch ein kommerzielles Produkt, GroBiotic<sup>®</sup>-A, untersucht. GroBiotic<sup>®</sup>-A besteht aus teilweise autolysierter Bierhefe, Milchbestandteilen und getrockneten Gärungsprodukten. Die Erforschung des Einsatzes von Präbiotika bei Fischen steckt jedoch noch in den Kinderschuhen und die Ergebnisse der Studien widersprechen sich oftmals. Während Burr *et al.* keinen Effekt von einer Supplementation mit Inulin fanden, stellten Mahious et al. und Reza et al. eine Verschiebung der Bakteriengesellschaft fest, wobei letzterer keine Zugabe von Inulin empfiehlt, weil zwar die Milchsäurebakterien gefördert werden, die mit Inulin gefütterten Fische jedoch teils schlechte Ergebnisse bzgl. anderer Faktoren wie Wachstumsrate zeigten (MAHIOUS et al., 2006; BURR et al., 2009; REZA et al., 2009). GroBiotic<sup>®</sup>-A konnte laut Li & Gatlin die Wachstums- und Überlebensrate verbessern und bot einen Schutz gegen eine Infektion mit Mykobakterien (LI & GATLIN III, 2005). Sealey *et al.* konnten hingegen keine Vorteile einer Zugabe zum Futter von GroBiotic<sup>®</sup>-A feststellen (SEALEY et al., 2007). Die Unterschiede könnten auf die unterschiedlichen Fischarten oder Dosierungen der Präbiotika-Beigabe zurückzuführen sein. Es bedarf weitere Forschung in diesem Bereich, bevor ein flächendeckender Einsatz sinnvoll erscheint.

### **3 Mikrobiomanalyse mittels Next-Generation Sequencing**

#### **3.1 16S-rRNA-Genamplikon-Sequenzierung**

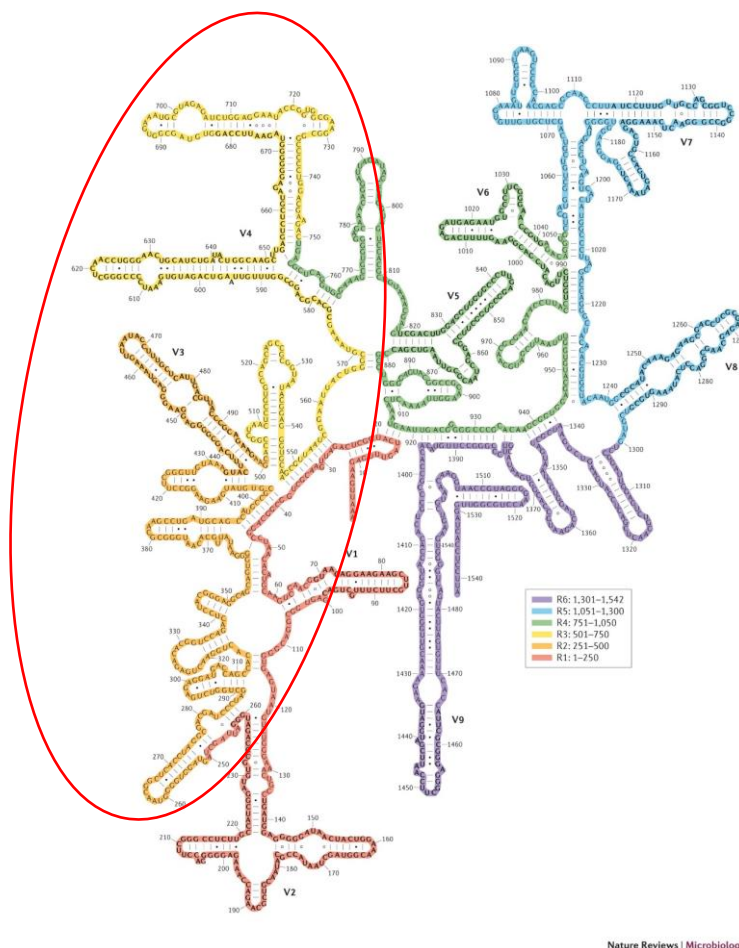
In der klassischen Mikrobiologie werden Bakterien unter anderem anhand morphologischer Kriterien, Wachstumsmuster (wie aerobes oder anaerobes Wachstum), Hämolysemuster und Färbung und vielen anderen Eigenschaften identifiziert. Eine sichere Identifikation einzelner Arten ist jedoch nicht immer sicher möglich, unter anderem da teilweise innerartliche Unterschiede größer sind als intraspezifische. Da der größte Teil der mikrobiellen Gemeinschaft bis heute zudem nicht kultivierbar bzw. nicht identifiziert ist, und die Anzucht von Mikroorganismen sehr zeitintensiv ist, gewannen in den vergangenen Jahren die molekularbiologischen Methoden zunehmend an Bedeutung (VENTER et al., 2004; ECKBURG et al., 2005; STEWART, 2012). Auch Versuche an Fischen zeigen, dass je nach Probe ein großer Teil der Bakteriengemeinschaft nicht kultivierbar ist (SPANGGAARD et al.,

2000; HUBER et al., 2004). Gleichzeitig ermöglichen molekularbiologische Methoden genauere Einblicke in verwandtschaftliche Beziehungen und damit auch in evolutionäre Entwicklungen der Organismen – ein Aspekt, der in den ersten Jahrzehnten der Bakterienforschung auch auf Grund begrenzter Möglichkeiten keine Beachtung fand (OLSEN et al., 1994).

Den ersten wichtigen Durchbruch in der Entwicklung molekularbiologischen Methoden machte Sanger mit der Kettenabbruchmethode, die lange der Goldstandard zur Bestimmung der Basenabfolge der DNA war (SANGER et al., 1977). In Bezug auf die Untersuchung komplexer Systeme wie dem Mikrobiom waren die Möglichkeiten mit der Sanger-Sequenzierung limitiert, da für jedes DNA-Fragment eine eigene Sequenzierung notwendig ist. Seit der kommerziellen Markteinführung im Jahr 2005 bietet das Next-Generation Sequencing (NGS) die Möglichkeit einer genomischen Hochdurchsatzanalyse (VOELKERDING et al., 2009). Während bei der Didesoxymethode nach Sanger (SANGER et al., 1977) nur eine Sequenz sequenziert werden kann, erlaubt es NGS tausende Sequenzen gleichzeitig zu generieren (LANGILLE et al., 2013). Dies ist die Voraussetzung für moderne Mikrobiomanalyse. Überdies war die Entwicklung mit sinkenden Kosten verbunden, ein Trend, der sich fortsetzt und einen breiten Einsatz der Technik ermöglicht (MINICH et al., 2018). NGS umfasst verschiedene Methoden, denen die hohe Parallelisierung, also die gleichzeitige Sequenzierung verschiedener Gene, gemein ist. Die verschiedenen Verfahren generieren Datensätze mit unterschiedlichen Leselängen und Fehlerraten und sind zudem unterschiedlich kosten- und zeitintensiv (TAN et al., 2015).

Eine Methode ist die schnelle und kosteneffiziente Sequenzierung von sogenannten Zielregionen (*targeted sequencing approaches*). Die wichtigste Zielregion für die Erforschung der bakteriellen Evolution und Ökologie ist das Gen der 16S-rRNA (VĚTROVSKÝ & BALDRIAN, 2013). Das ribosomale Gen, das von WOESE et al. (1990) deren Einsatz als Grundlage für die phylogenetische Taxonomie etabliert wurde, codiert für die 16S ribosomale RNA, die ein Teil der kleineren 30S-Untereinheit der prokaryotischen Ribosomen ist. Ribosomen werden über Ihren Sedimentationskoeffizienten definiert, dessen Maßeinheit Svedberg (S) ist. Der Sedimentationskoeffizienten bei Eukaryoten ist 80S und bei Prokaryoten 70S. Das 70S-Ribosom der Prokaryoten wiederum besteht aus einer kleinen (30S) und einer großen (50S) Untereinheit (KING et al., 2006). Das *16S-rRNA*-Gen besteht aus hyper-

variablen und konservierten Regionen und besitzt eine Gesamtlänge von 1.542 Basenpaaren (bp; *E. coli* Referenzgenom; siehe Abbildung 6). Während die konservierten Regionen bei fast allen Bakterien größtenteils übereinstimmen und sich daher als Bindungsregion für unspezifische Primer eignen, sind die neun hypervariablen Regionen (V1 - V9) mit einer Länge von 30 bp bis 100 bp oft artspezifisch und daher zur Identifikation von Bakterientaxa geeignet. *16S-rRNA*-Genamplikon-Sequenzierung ermöglicht folglich die Erstellung von Stammbäumen und ist ein wichtiges Instrument bei der Charakterisierung der phylogenetischen Zusammensetzung von mikrobiellen Gemeinschaften. Die taxonomische Zuordnung der Sequenzierungsergebnisse erfolgt über den Abgleich mit Referenzsequenzen großer Datenbanken, wie z.B. dem Ribosomal Database Project (RDP) SILVA, Greengenes, EzBiocloud oder der SILK European Ribosomal RNA database.



### Abbildung 6: 16S ribosomal RNA

Modifiziert nach YARZA et al. (2014); die hoch variablen Regionen von V3 und V4, die in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden, sind rot umrandet.

Der Ablauf von molekulargenetischen Untersuchungen von Mikroorganismengemeinschaften folgt grundsätzlich dem gleichen Schema (siehe Abbildung 7). Nach der Probennahme erfolgen eine DNA-Extraktion und eine Sequenzierung. Nach der Qualitätskontrolle und einem Ausfiltern der Chimären (verzerrte Artefakte, die aus zusammengeführten Sequenzen aus mehreren Ursprüngen entstehen) werden die Daten in Form von FASTA-Dateien zur Verfügung gestellt. Durch eine Vorverarbeitung der Rohdaten z.B. mit der Online-Plattform IMNGS werden OTU-Tabellen und taxonomischen Bäumen bereitgestellt, die im Anschluss analysiert werden können (LAGKOUVARDOS et al., 2016).



**Abbildung 7: Ablauf von Experimenten mit thematischer Zielsetzung der Mikroorganismenanalyse**

Die Methodik der DNA-Extraktion, des bioinformatischen *Reprocessing* mit IMNGS und der Statistische Analyse mit Rhea werden im Methodenteil der Veröffentlichung (siehe Kapitel III.1) näher beleuchtet.

### 3.2 Next-Generation Sequencing von Illumina

Die Sequenzierung der Mikrobiomproben in dieser Studie erfolgte mittels dem Illumina MiSeq (siehe Abbildung 8). Zielregion war die V3/V4 Region des *16S-rRNA*-Gens, die mittels der Illumina *Sequencing by Synthesis* Technologie (dt. Sequenzierung durch Synthese; SBS) untersucht wurde.



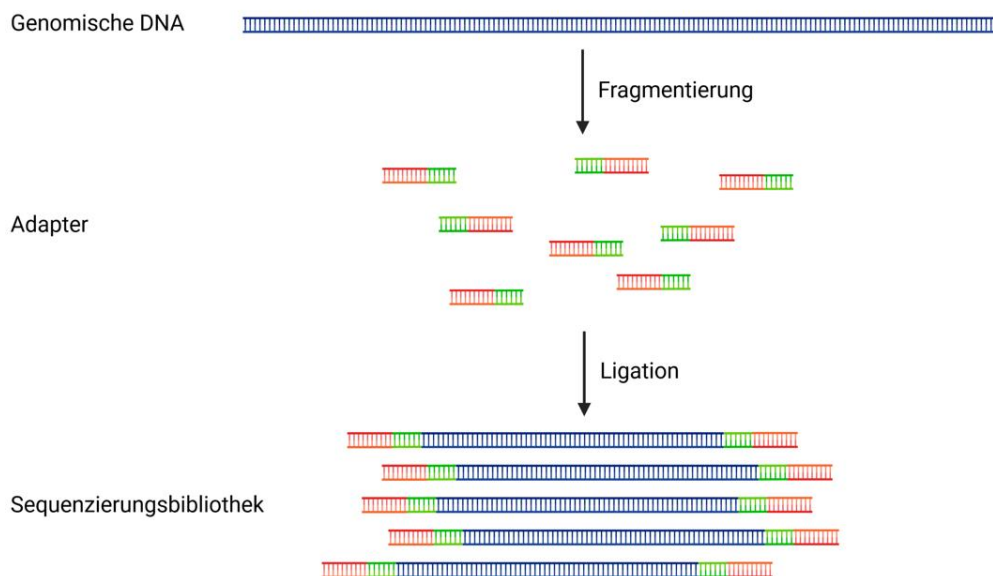
**Abbildung 8: Sequenzierungsgerät Illumina MiSeq**

Zur Verfügung gestellt von Illumina, Inc.

Die SBS von Illumina ist eine Sequenzierungstechnologie, mittels der laut Illumina mehr als 90 % der weltweiten Sequenzierungsdaten generiert werden (ILLUMINA INC., 2017). Die von Illumina genutzte Sequenzierungstechnik basiert auf der kovalenten Bindung zufällig fragmentierter DNA-Stücke auf einem Glasobjektträger der Fließzelle (engl. *flow cell*) und einer anschließenden Amplifikation, bei der die genomische DNA zunächst vervielfältigt wird und anschließend mittels optischer Verfahren die Basenabfolge erfasst wird. Die Erklärung der Illumina *Sequencing by Synthesis* Technologie der folgenden Unterkapitel stammt, falls nicht anders vermerkt, aus „*An introduction to Next-Generation Sequencing Technology*“ (ILLUMINA INC., 2017) sowie dem Video „*Sequencing: Introduction to Sequencing by Synthesis (SBS)*“ (ILLUMINA INC., 2021)

### 3.2.1 Vorbereitung der Sequenzierbibliothek

Zu Beginn der Sequenzierung wird die genomische DNA der Proben mechanisch fragmentiert. Nach der Fragmentierung werden an die DNA-Stücke an beiden Enden je ein Adapter gebunden (= Ligation), um die Bibliothek (engl. *library*) zu bilden (siehe Abbildung 9; ILLUMINA INC., 2017).



**Abbildung 9: Vorbereitung der Sequenzierbibliothek.**

Abbildung erstellt mit BioRender.com

die Bibliothek wird durch Fragmentierung einer genomischen DNA-Probe und Ligation spezieller Adapter an beide Fragmentenden hergestellt. Eigene Darstellung nach (ILLUMINA INC., 2017a).

Die Adapter sind doppelsträngige Oligonukleotide. Jeder Bibliotheksstrang muss

anschließend jeweils eine P5 und eine P7- Bindungsregion aufweisen, einen komplementären Bereich zu den immobilisierten Oligonukleotide auf der Oberfläche der Fließzelle, der es ermöglicht an die Fließzelle zu binden. Ebenfalls Teil des Adapters ist eine Index-Sequenz aus sechs bis zehn Nukleotiden. Da später verschiedene Proben gemischt werden, können später nur so die einzelne Probe differenziert werden (siehe hierzu auch Kapitel 3.2.3). Zuletzt muss der Adapter über eine Bindungsregion verfügen, an die die Sequenzierungs-Primer binden und so den Read 1 und Read 2 aktivieren (Rd1 SP und Rd2 SP; siehe Abbildung 10; ILLUMINA INC., 2008).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung eines Dual-Index-Fragments.**

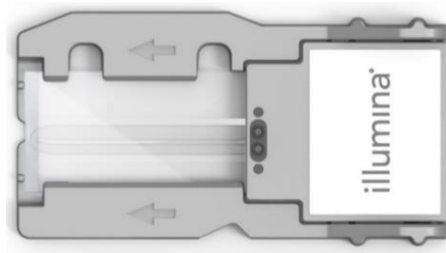
Eigene Darstellung nach Illumina Inc. „*Illumina adapter portfolio*“ (ILLUMINA INC., 2008).

Rd1 SP: Bindungsstelle Sequenzierungs-Primer Read 1, Rd2 SP: Bindungsstelle Sequenzierungs-Primer Read 1

Abbildung erstellt mit BioRender.com

### 3.2.2 Cluster Generierung

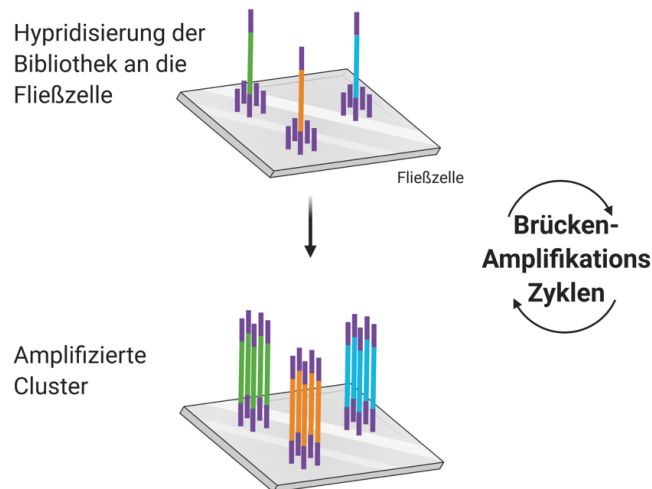
Nach der Bindung der Adapter an die DNA-Fragmente wird die Bibliothek auf die Fließzelle (engl. *flow cell*) aufgetragen, wo die Sequenzierung stattfindet (siehe Abbildung 11). Die Fließzelle ist ein Glasobjektträger mit Fluidkanälen, in denen sich die Sequenzierungschemikalien befinden. Die Fließzellen sind spezifisch für das Sequenzierungsgerät. Die für Illumina MiSeq verwendete Fließzelle erlaubt eine zufällige Verteilung der Cluster, während bei anderen Systemen auch definierte Abstände zwischen den Clustern vorgegeben sind.



**Abbildung 11: MiSeq-Fließzelle**

Zur Verfügung gestellt von Illumina, Inc.

## Cluster Amplifikation



**Abbildung 12: Cluster Amplifikation**

Die vorbereitete Bibliothek wird auf die Fließzelle gegeben und die Fragmente binden an die Oberfläche. Mittels Brückenamplifikation werden die gebundenen Fragmente vervielfältigt und bilden Cluster.

Eigene Darstellung nach (ILLUMINA INC., 2017a); Abbildung erstellt mit BioRender.com

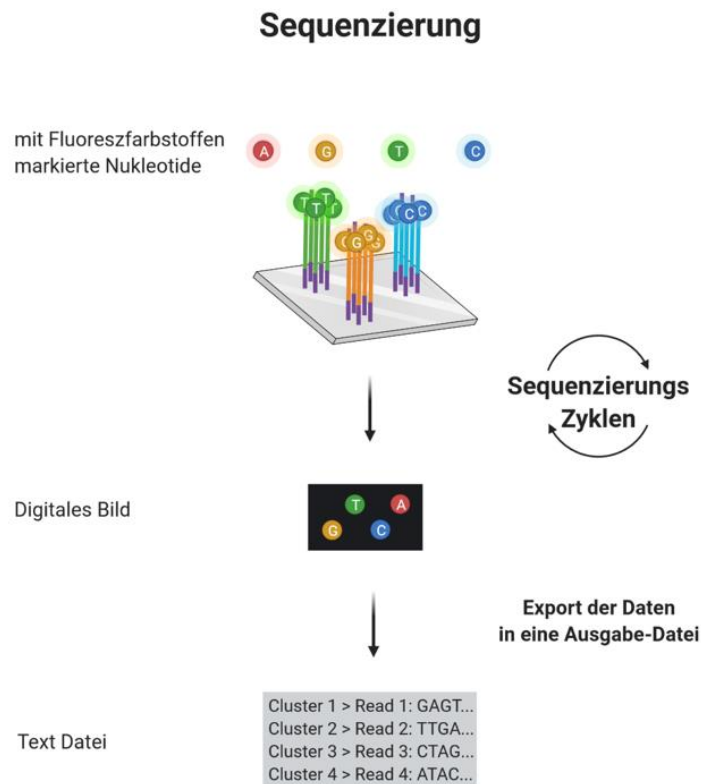
Die Oberfläche der Fließzelle ist mit Oligonukleotide beschichtet, die komplementär zu den Bindungsregionen der zuvor an die DNA-Fragmente ligierten Adapter sind. Bei Zugabe der Bibliotheks-DNA hybridisieren die Adapter der DNA reversibel (keine kovalente Bindung) an die 5'-Enden der Oligonukleotide (siehe Abbildung 12). Die Bibliotheks-DNA wird ausgehend von dem an die Fließzelle gebundenen Ende polymerisiert. Der DNA-Doppelstrang wird bei der Denaturierung in zwei Einzelstränge gespalten. Die Original-DNA-Matrize der nun doppelsträngig vorliegenden DNA wird weggespült und zurück bleibt der kovalent an die Fließzelle gebundene neu synthetisierte DNA-Strang. Nun folgt die Brückenamplifikation (engl. *solid-phase bridge amplification*). Die einzelsträngige DNA klappt um und bindet an die freien 5'-Enden der an die Fließzelle gebunden Oligonukleotide und bildet damit die namensgebende Brücke. Vom 5'-Ende ausgehend wird erneut der Gegenstrang synthetisiert. Der DNA-Doppelstrang wird denaturiert d.h.in zwei Einzelstränge gespalten, wobei der neu synthetisierte Strang mit der P7- Bindungsregion an die Fließzelle gebunden ist. Im nächsten Zyklus binden nun beide Stränge mit dem jeweils anderen Ende erneut an die Fließzelle und bilden somit zwei Brücken, an denen jeweils ein neuer Strang synthetisiert wird. Dadurch bilden sich Cluster mit identischen DNA-Strängen. Jedes Cluster hat

tausende Kopien des gleichen Strangs, die benötigt werden, um bei der eigentlichen Sequenzierung ein ausreichend starkes Signal zu erzeugen. Am Ende der Amplifikation werden die *Reverse*-stränge gewaschen und die Enden blockiert, um ein unerwünschtes Binden von Primern zu verhindern.

### 3.2.3 Sequenzierung

Illumina MiSeq nutzt die vier Kanal-SBS-Technologie, bei der nach jedem Zyklus insgesamt vier Bilder erstellt werden. Bei dieser Methode werden auf die Fließzelle dNTPs (*deoxynucleotide triphosphate*) gegeben mit je einem Fluoreszenzfarbstoff und mit einer Blockierungs-/Schutzgruppe (engl. *terminator*). Für jede Base wird ein eigener Farbstoff verwendet, der bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird. Die dNTPs werden entsprechend der Basenabfolge komplementär an den DNA-Strang polymerisiert. Durch die Schutzgruppe wird sichergestellt, dass nicht mehrere Nukleotide in einem Zyklus eingebaut werden können. Die freien dNTPs werden durch einen Waschschrift entfernt. Mittels photographischer Detektion werden die eingebauten Nukleotide bestimmt (siehe Abbildung 13). Die Stärke des Signals hängt von der Menge der eingebauten Nukleotide ab. Während eines Zyklus taucht jeder Cluster nur auf einem der vier Bilder auf. Der Fluoreszenzfarbstoff und die Blockierungsgruppe werden anschließend ebenfalls gewaschen. Im nächsten Zyklus wird der Vorgang wiederholt und ein Bild erstellt, und somit die Fluoreszenzintensität gemessen und dokumentiert. (ILLUMINA INC., 2016, 2017). Die Sequenzierung erfolgt in beide Leserichtungen und ist somit ein sogenannter *paired-end-run*. Die Anzahl der Zyklen ist von der jeweiligen Fragmentlänge der DNA abhängig.





**Abbildung 13: Sequenzierung**

Einbau der fluoreszenzmarkierten Nucleotide während der Sequenzierung und Detektion der Lichtsignale; eigene Darstellung nach (ILLUMINA INC., 2017).

Abbildung erstellt mit BioRender.com

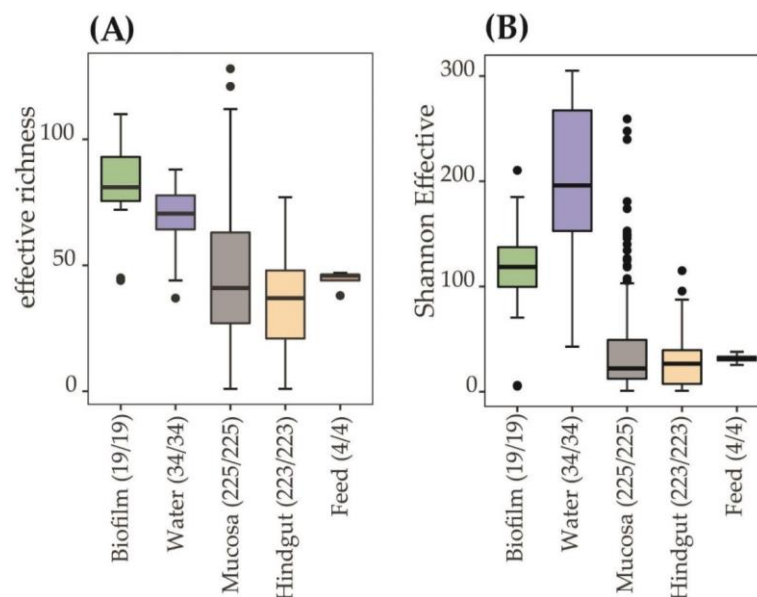
### 3.3 Datenanalyse

Es gibt zahlreiche Methoden der Analyse der durch die Sequenzierung generierten *16S-rRNA*-Genamplikon-Daten, z.B. durch die von Illumina bereitgestellte Pipeline. Eine der vielen Möglichkeiten sind die Pipelines IMNGS und Rhea, die in Online- und Offline-Variante existieren und eng aufeinander abgestimmt sind. Die Rohdaten in Form von FASTQ-Dateien (textbasiertes Format zum Speichern einer biologischen Sequenz) werden mit der IMNGS-Pipeline (LAGKOUVARDOS et al., 2016), einer UPARSE-basierten Plattform (EDGAR, 2013) vorverarbeitet. IMNGS liefert sowohl operative taxonomische Einheiten (engl. *operational taxonomic unit*; OTUs) als auch „*denoised zero-radiation*“ operative taxonomische Einheiten (zOTUs) für verschiedene Teile der Analyse. Während OTUs bei 97 % Sequenzähnlichkeit geclustert werden, werden zOTUs nur getrimmt (EDGAR, 2010, 2016; LAGKOUVARDOS et al., 2016). Die anschließende Datenanalyse erfolgt mit Rhea, einer modularen Pipeline für mikrobielle Profilerstellung von *16S-rRNA*-Genamplikon-Sequenzierungsdaten in einer R-Programmierungsumgebung

(LAGKOUVARDOS et al., 2017). Der erste Schritt der Datenanalyse ist die Normalisierung, ohne die eine nachgeschaltete Analyse nicht möglich ist. Rhea nutzt hierfür das sog. *rarefying* (dt. verfeinern). Hierbei werden die Daten auf die Anzahl der Gesamtreads (in der Regel die geringste Anzahl) normalisiert. Durch die Datentransformation können störende Effekte unterschiedlicher Probengrößen entfernt werden (LAGKOUVARDOS et al., 2017). Anschließend an die Normalisierung folgen die Analyseschritte  $\alpha$ -Diversität,  $\beta$ -Diversität und die taxonomische Eingruppierung der Proben.

### 3.3.1 Alpha-Diversität

Die Begriffe Alpha-Diversität ( $\alpha$ -Diversität) und Beta-Diversität ( $\beta$ -Diversität) wurden erstmals von Whittaker (WHITTAKER, 1960) eingeführt. Die  $\alpha$ -Diversität bezog sich ursprünglich auf ein Gebiet oder eine Landschaft und beschreibt die interne Diversität (WHITTAKER et al., 2001). Bei Mikrobiomproben beschreibt die  $\alpha$ -Diversität die Vielfalt der OTUs innerhalb einer bestimmten Probe. Die  $\alpha$ -Diversität kann in Form der (*species*) *richness* (dt. (Arten-)Reichtum) angegeben werden, ein Wert, der die Anzahl der OTUs in einer Probe wiedergibt (Abbildung 14). Der Nachteil der *richness* ist, dass die Struktur der Gemeinschaft nicht erfasst wird und sie keine Auskunft darüber gibt, ob alle gezählten Arten gleich oft oder in unterschiedlichen Abundanzen (Häufigkeit) in der Probe vorkommen (LAGKOUVARDOS et al., 2017).



**Abbildung 14: richness von Fisch- und Umweltmikrobiomproben.**

Nachbearbeitete Ausgabe des Rhea-Skript „Serial group comparisons“

Neben der *richness* gibt es noch weitere Indizes, die die  $\alpha$ -Diversität darstellen und zudem die Struktur der Gemeinschaft erfassen. Rhea bietet die Möglichkeit zwei dieser Indizes, den Shannon-Index (SHANNON, 2001) und den Simpson-Index (SIMPSON, 1949) zu errechnen. Alle mit Rhea berechneten Indizes können auch als effektive Variante ausgegeben werden (LAGKOUVARDOS et al., 2017). Für die  $\alpha$ -Diversität werden OTUs mit Arten gleichgesetzt – die *richness* wird auch als *species richness* bezeichnet. Die  $\alpha$ -Diversität wird daher anhand der OTUs ermittelt. Für ein und dieselbe Spezies können mehrere zOTUs vorliegen, die sich nur an wenigen Stellen im Genom unterscheiden. Überdies können Bakterien mehrere Kopien des *16S-rRNA*-Gens besitzen, die nicht hundertprozentig übereinstimmen und somit für ein und dasselbe Bakterium zwei zOTUS ausgegeben werden (VĚTROVSKÝ & BALDRIAN, 2013). zOTUS sind daher ungeeignet für die Bestimmung der *richness*.

### 3.3.2 Beta-Diversität

Während die  $\alpha$ -Diversität etwas über die Artenvielfalt innerhalb einer Probe aussagt, ist die  $\beta$ -Diversität ein Maß für den Unterschied zwischen verschiedenen Proben, Gruppen oder Populationen. Die  $\beta$ -Diversität wird von verschiedenen Wissenschaftlern unterschiedlich definiert und errechnet (TUOMISTO, 2010a; TUOMISTO, 2010b). In Rhea wird die  $\beta$ -Diversität über den generalisierten Uni-Frac berechnet (CHEN et al., 2012). Im Vergleich zum oft verwendeten Bray Curtis, der nur die gemeinsame taxonomische Zusammensetzung der Proben berücksichtigt (BRAY & CURTIS, 1957) und dem gewichteten und ungewichteten Uni-Frac (LOZUPONE et al., 2007), berücksichtigt er nicht nur die taxonomische Zusammensetzung der Proben, sondern reagiert weniger empfindlich auf seltene oder sehr häufige OTUs (LAGKOUVARDOS et al., 2017). Die Visualisierung der generierten Abstandsmatrizen erfolgt über mehrdimensionale Skalierung (MDS) und nicht-metrische MDS (NMDS; siehe Abbildung 15). Über einen PERMANOVA-Test wird geprüft, ob die Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant sind (LAGKOUVARDOS et al., 2017).

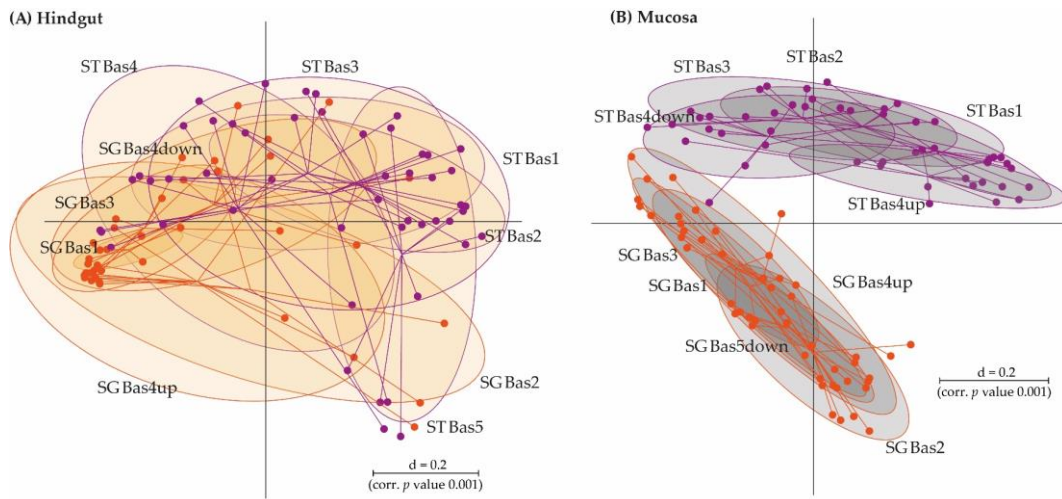


Abbildung 15: Graphische Darstellung der  $\beta$ -Diversität als MDS – Plot

## III. PUBLIKATION

### 1 Publikation Fischmikrobiom



microorganisms



Article

# The Development of the Bacterial Community of Brown Trout (*Salmo trutta*) during Ontogeny

Katharina Keiz <sup>1</sup>, Sebastian Ulrich <sup>1</sup>, Jasmin Wenderlein <sup>1</sup>, Patrick Keferloher <sup>2</sup>, Anna Wiesinger <sup>1</sup>, Klaus Neuhaus <sup>3</sup>, Ilias Lagkouvardos <sup>3,4</sup>, Helmut Wedekind <sup>2</sup> and Reinhard K. Straubinger <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Institute of Infectious Diseases and Zoonosis, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany
- <sup>2</sup> Bavarian State Research Center for Agriculture (LfL), Institute for Fisheries (IFI), Weilheimer Straße 8, 82319 Starnberg, Germany
- <sup>3</sup> Core Facility Microbiome, ZIEL—Institute for Food & Health, Technical University of Munich, Weißenstephaner Berg 3, 85354 Freising, Germany
- <sup>4</sup> Hellenic Centre for Marine Research (HCMR), Institute of Marine Biology and Aquaculture (IMBBC), 715 00 Heraklion, Greece
- \* Correspondence: r.straubinger@lmu.de

**Abstract:** Brown trout (*Salmo trutta*) is an important aquaculture species in Germany, but its production faces challenges due to global warming and a high embryo mortality. Climate factors might influence the fish's bacterial community (BC) and thus increase embryo mortality. Yet, knowledge of the physiological BC during ontogeny in general is scarce. In this project, the BC of brown trout has been investigated in a period from unfertilized egg to 95 days post fertilization (dpf) using 16S rRNA gene amplicon sequencing. Developmental changes differed between early and late ontogeny and major differences in BC occurred especially during early developmental stages. Thus, analysis was conducted separately for 0 to 67 dpf and from 67 to 95 dpf. All analyzed stages were sampled in toto to avoid bias due to different sampling methods in different developmental stages. The most abundant phylum in the BC of all developmental stages was Pseudomonadota, while only two families (Comamonadaceae and Moraxellaceae) occurred in all developmental stages. The early developmental stages until 67 dpf displayed greater shifts in their BC regarding bacterial richness, microbial diversity, and taxonomic composition. Thereafter, in the fry stages, the BC seemed to stabilize and changes were moderate. In future studies, a reduction in the sampling time frames during early development, an increase in sampling numbers, and an attempt for biological reproduction in order to characterize the causes of these variations is recommended.

**Keywords:** fish; brown trout; *Salmo trutta*; development; ontogeny; microbiome; bacterial community



**Citation:** Keiz, K.; Ulrich, S.; Wenderlein, J.; Keferloher, P.; Wiesinger, A.; Neuhaus, K.; Lagkouvardos, I.; Wedekind, H.; Straubinger, R.K. The Development of the Bacterial Community of Brown Trout (*Salmo trutta*) during Ontogeny. *Microorganisms* **2023**, *11*, 211. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010211>

Academic Editors: Shimei Lin and Yongjun Chen

Received: 22 December 2022

Revised: 9 January 2023

Accepted: 11 January 2023

Published: 14 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

A fast-growing world population goes hand in hand with an increasing demand for high-quality protein sources [1]. Between 1961 and 2017, fish consumption increased at an average annual rate of 2.4% to meet this need [2]. Consequently, global capture and aquaculture fisheries both reached record production in 2018 [3]. Further rises in fish production cannot be expected, as fishing quotas can no longer be increased considerably in the future as the global fish stocks are already in a critical condition and declining [4]. Therefore, the importance of aquaculture will further increase. Salmonids (Salmonidae) such as salmon and trout (both *Salmo* and *Oncorhynchus* species) are popular food fish and a good source of high-quality animal protein [5,6]. Many salmonid species are raised in large net pens in coastal areas. These marine farming methods lead to some ecological and environmental problems, such as the unfiltered emission of drugs and feces into the surrounding water [7]. The contamination of water is worrying, especially when One Health concerns are considered, as feces might contain pathogens and the use of antibiotics



might lead to the spread of resistance genes and resistant bacteria via the water [8]. Further, the maintenance of clean water is goal number six of the UN Sustainable development goals [9] and must be taken seriously. Thus inland fish production of trout in small pond-based fish farms with filtration systems and sedimentation of suspended solids is likely the more ecological option [10]. Another advantage of local fish production is its excellent ecological performance by eliminating long transport routes [11]. The brown trout (*Salmo trutta*) is native to Eurasia and North Africa [12]. In Germany, the farming of salmonids is practiced mostly in earthen or concrete ponds, managed as flow-through systems. The production of brown trout is used for human consumption, as well as for stocking purposes.

Even though inland trout aquaculture has a long tradition, it faces various challenges due to climate change. Increasing water temperatures and periods of low runoff limit the availability of cold, oxygen-rich water needed in salmonid production [13–15]. However, suboptimal water quality parameters affect the fish's fitness negatively and alter the microbiome of aquatic organisms often detrimentally [16–18]. In the future, these obstacles and limitations must be overcome to maintain or increase output. Thus, to benefit or even increase fish health and fitness the manipulation of the bacterial community (BC), especially in early life stages, might be an option. The BC comprise all bacterial members of the microbiome, which itself is defined as the entirety of all microorganisms (bacteria, archaea, lower and higher eukaryotes, and viruses), their genomes, and the environmental conditions surrounding them in a given habitat [19]. The BC within a host organism is essential for immune defense and vertebrate health [20,21]. Therefore, a dysbiosis of the BC due to changed environmental conditions increases the fish's susceptibility to infection [22,23]. As fish are surrounded by water and microorganisms during their entire lifetime [24], they are directly and immediately confronted with the microbiome in their habitat to a greater extent than terrestrial organisms. Thus, embryonic stages are under strong pathogen pressure and the egg's surface additionally provides a suitable substrate for bacterial growth [25,26]. It has been suggested that the BC on the embryo's surface influences embryonic death [18]. Understanding the microbiome's development during rearing is essential to provide optimal conditions after hatching when organs of the immune system develop [27]. The development of the microbiome and its balance is complex in a fish farm, where many different environmental factors, e.g., water temperature [28], diet [29], and handling [30], influence the microbiome. Further, stress factors (i.e., environmental or populational) to which the fish is exposed in early developmental stages can have long-lasting effects on the BC [31]. A poor health status in some aquaculture facilities is an economic problem and can limit the number of fish produced.

The brown trout is one of the economically most important freshwater salmonids produced in Bavaria, Germany [32]. Knowledge of the composition of the microbiome of brown trout is scarce, especially considering the early developmental stages. Existing research focuses mainly on the vegetarian and thus resource-friendly feeding of brown trout and other salmonids [33,34]. The BCs investigated in other studies often were only analyzed in view of higher taxa level. Even at the phylum level, significant differences between several studies are apparent, each containing divergent results regarding the most dominant phyla [23,35,36]. The basis for possible intervention pathways regarding the BC, with a focal point on the prevention of diseases, is a comprehensive knowledge of the typical microbiota of the brown trout during embryonal and early development. Therefore, the aim of the present study was the description of the development of the BC during ontogeny. Using 16S rRNA gene amplicon sequencing, we characterized the BC of the whole fish from unfertilized egg to fry and compared these life stages.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Fish Management

All experiments involving brown trout were conducted in compliance with the requirements of the German Animal Welfare Act [37]. The fish were reared at Bavarian State Research Center for Agriculture, Institute for Fisheries (Starnberg, Germany). The use of animals did not demand governmental approval as the animals were reared in a commercial and scientific fish farm. During the experiment, no harmful interventions were conducted. Fish were narcotized and then killed using decapitation according to the Council Regulation (EC) No. 1099/2009 and the German *Tierschutz-Schlachtverordnung* (Animal Welfare Slaughter Ordinance) [38,39].

The parental fish originated from the Institute's breeding stock, which is kept for research purposes. In January 2020, a total of 20 milers and 20 spawners were stripped on two dates with a time difference of 14 days (line A and line B). Every female was crossed with several males to increase the genetic diversity of the experimental fish. Therefore, eggs from the same spawner were fertilized with sperm of different milers from the same population. The brown trout of the two lines entered the different developmental stages at different timepoints and were sampled accordingly with a time delay of 14 days.

After fertilization, the eggs were placed in horizontal breeding troughs with egg incubation baskets, ensuring a constant flow of degassed and aerated spring water. The brown trout eggs from line A (approximately 30,000) were randomly distributed among two commercial hatching troughs, while the comparatively fewer brown trout eggs from line B (approximately 20,000) fitted into a single trough. The incubation baskets were further used for start-feeding the swim-up fry after the yolk sac had been absorbed. Afterward, the incubation baskets were removed, and the fry were kept directly in the troughs. Temperature, pH, oxygen content, and conductivity were measured on every sampling day (mean temperature =  $10.21 \pm 0.14$  °C, mean pH =  $7.67 \pm 0.03$ , mean oxygen =  $12.99 \pm 0.49$  mg/L, mean conductivity =  $799 \pm 5$   $\mu$ S/cm).

The brown trout larvae hatched 39 to 40 days post fertilization (dpf). Feeding was initiated at 67 dpf. The fish were then hand-fed several times a day to satiety, using a dry commercial diet (INICIO Plus, BioMar A/S, Brande, Denmark).

To describe the development of the microbiome during ontogeny, six samples from line A and five samples from B were collected from the following developmental stages: unfertilized eggs (EGG, 0 dpf), eyed eggs (EYG, 35 dpf), sac fry (SCF, 48 dpf), and swim-up fry (SUF, 67 dpf). Furthermore, five samples were collected from the older fry stages of both lines on 69 dpf (FY1), 74 dpf (FY2), 82 dpf (FY3), 88 dpf (FY4), and 95 dpf (FY5). The total duration of the trial was 95 days.

### 2.2. Post-Mortem Sampling

In total, 99 samples were collected from all developmental stages for microbiome analysis, whereby 56 samples were available for the final analysis. SCF, SUF, and FY1-FY5 stages were narcotized and immediately killed by decapitation [38]. Due to size limitations and the lack of differentiation of the gastrointestinal tract before first feeding the samples from SCF and SUF were transferred *in toto* into a 2.0 mL reaction tube (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) prefilled with 600  $\mu$ L of Stool DNA Stabilizer (Invitek Molecular GmbH, Berlin, Germany). The tubes were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C. To avoid biases due to the sampling method, the same procedure using the entire fish was carried out with the stages FY1-FY5, without differentiation of different body parts and organs such as the intestines. EGG and EYG were immediately transferred *in toto* to a 2.0 mL reaction tube (Eppendorf AG) prefilled with 600  $\mu$ L of DNA-Stool Stabilizer (Invitek Molecular GmbH) and flash-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C.

When sampling for this experiment was finished, all samples were transferred on dry ice to the ZIEL—Institute for Food & Health of the Technical University of Munich for analysis.



### 2.3. Metagenomic DNA Extraction

Metagenomic DNA was extracted according to a modified protocol by Godon et al. (1997) [40] as described previously by Reitmeier et al. (2021) [41]. Briefly, the complete material was transferred into 2.0 mL lysing matrix B tubes (MP Biomedicals GmbH, Eschwege, Germany), prefilled with 0.1 mm silica beads. After adding guanidinium thiocyanate and N-lauroylsarcosine, samples were homogenized with a FastPrep-24<sup>®</sup> (MP Biomedicals GmbH) using three cycles (40 s, 6.5 m/s) and cooling with dry ice. Then, polyvinylpyrrolidone was added and after centrifuging the supernatant was treated with RNase A. DNA was cleaned up using columns and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further processing.

### 2.4. 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing

The composition of the BC of the complete fish at different developmental stages was assessed by high throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing of the V3/V4-regions at Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Germany). The amplification was conducted via a two-step PCR using primers 341F and 785R [42]. The first PCR amplified the V-regions of the 16S rRNA target gene. A sample-unique barcode and Illumina sequencing adaptors were added to both ends in the second PCR to each amplicon. The DNA concentrations were measured and adjusted to the required DNA quantity. Pooled samples were sequenced, using reagent kit v3, in paired-end mode ( $2 \times 300$  bp) in a MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA).

### 2.5. Data Processing

The 16S rRNA gene amplicon data were analyzed as described previously [43]. Briefly, at first, all fastq files were processed using the “Integrated Microbial Next-Generation Sequencing” (IMNGS) pipeline [44], a UPARSE-based platform [45]. Sequences were filtered (quality trimming score of less than 15) and paired. Paired reads with expected errors of less than two and sequences with a length smaller than 300 and higher than 600 nucleotides were excluded. Further, remaining reads were trimmed for ten nucleotides on each end, removing primers partially. The presence of chimeras was tested with UCHIME [46]. Following the first processing on the IMNGS platform, samples with a read count less than 100 and non-sufficient quality observed in rarefaction curves have been excluded from further analysis. Thus, secondly, remaining data were re-submitted to IMNGS pipeline for the final analysis. The most recent version of IMNGS supplies operational taxonomic units (OTUs) and denoised zero-radius operational-taxonomic units (zOTUs) for different parts of the analysis. OTUs were clustered at 97% sequence similarity [44], while zOTUs were calculated using UNOISE 2 [47] from the USEARCH 11 package [48]. Only those OTUs and zOTUs occurring with at least 0.25% relative abundance in at least one sample were kept for further analysis. Taxonomy was assigned at an 80% confidence level with SILVA [49].

Afterward, the data provided by IMNGS was refined by manually editing the automated phylogenetic tree and taxonomy using SILVA [49]. Sequences were re-aligned and improved phylogenetic trees were afterwards constructed using the neighbor-joining method available on the software MEGA X [50]. Taxonomy was checked using the 16S-based ID provided by EzBioCloud and, if necessary, adapted [51]. Further, the taxonomy was refined according to the nomenclature provided by the LPSN database [52] using the phylum names introduced in 2021 [53]. Since this leads to a renaming of all phyla occurring in this study, the former names are given in parentheses (at the first mention) for better comparability with older studies.

All downstream analyses were carried out using Rhea [54], a modular pipeline for microbial profiling of 16S rRNA gene amplicon sequencing data in an R programming environment (R 4.1.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) as described previously [54]. The pipeline is available on the GitHub repository (<https://github.com/Lagkouvardos/Rhea>, accessed on 7 September 2022). The OTU and zOTU tables of all experimental samples can be found in the Supplementary Material (Tables S1 and S2).



For the  $\alpha$ -diversity, the effective richness and the effective Shannon diversity were calculated using OTUs [55]. All further parameters were calculated using zOTUs. Based on generalized UniFrac distances,  $\beta$ -diversity was calculated [56]. The Benjamini-Hochberg method was used for correcting  $p$  values for multiple testing [57]. For statistical testing, taxa with a prevalence equal to or more than 20% (proportion of samples positive for the respective taxa) in at least one of the groups and a relative abundance of equal to or more than 0.25% were considered. For multiple groups, a Kruskal–Wallis rank-sum test was applied. Subsequently, the Wilcoxon rank-sum test was used for pairwise comparisons. A non-linear Fisher’s exact test was used to determine the differences between samples with a low prevalence.

Data were visualized using Illustrator CS6 version 16.0.0 (Adobe Inc., San José, CA, USA). The most abundant taxa were visualized using the software Prism, version 2010 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Venn diagrams were created using Origin Pro version 2021 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

### 3. Results

An average of 11,858 sequences (SD = 9065) per sample was obtained from the 16S rRNA gene amplification, accounting for 664,052 sequences in total. A total of 515 molecular species were found at the OTU level (operational taxonomic unit), while the analysis at the zOTU level (zero-radius operational taxonomic unit; molecular strains) yielded 886 zOTUs [58].

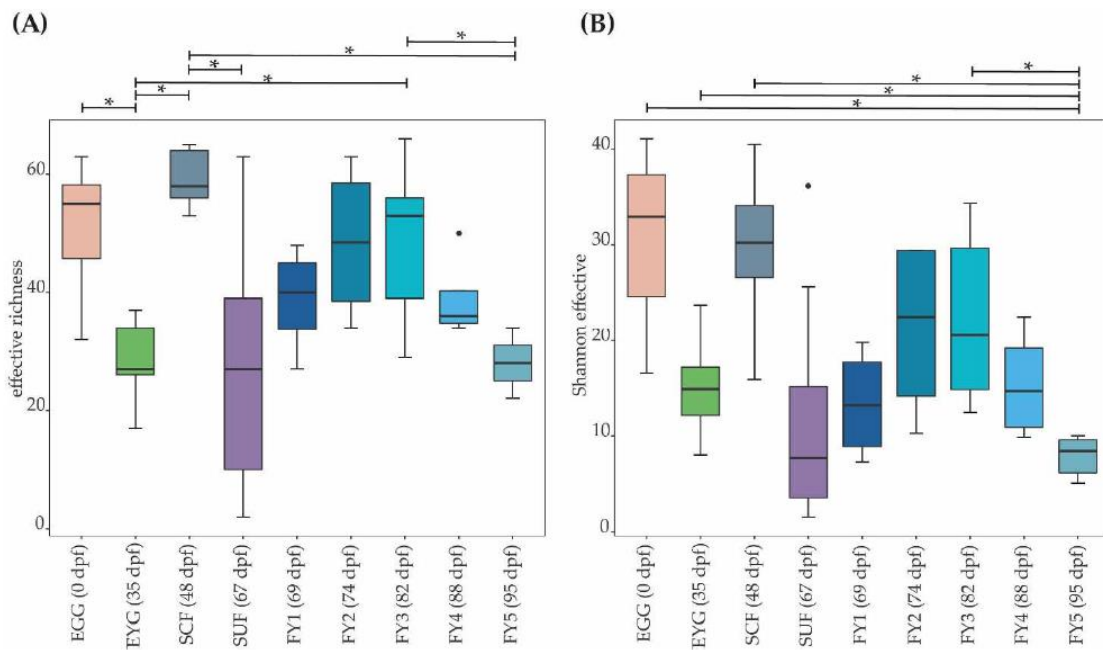
$\alpha$ -diversity was analyzed at the OTU level, considering effective richness and Shannon effective diversity (Table 1, Figure 1). Samples EGG and SCF displayed the highest  $\alpha$ -diversity parameters. Interestingly, in the EYG stages, a lower effective richness and Shannon effective diversity was observed compared to the developmental stages before and after EYG (i.e., EGG and SCF). The difference in effective richness was significant between EYG and the stages EGG, SCF, and FY3. Furthermore, the effective richness for SUF displayed the highest overall distribution. Species diversity initially increased from SUF to FY3. After reaching the highest effective richness of the late developmental stages in FY3, species diversity decreased until the last sampling time point in stage FY5, with a significant difference between FY3 and FY5 ( $p \leq 0.05$ ).

**Table 1.** Read count and  $\alpha$ -diversity (effective richness) as average mean.

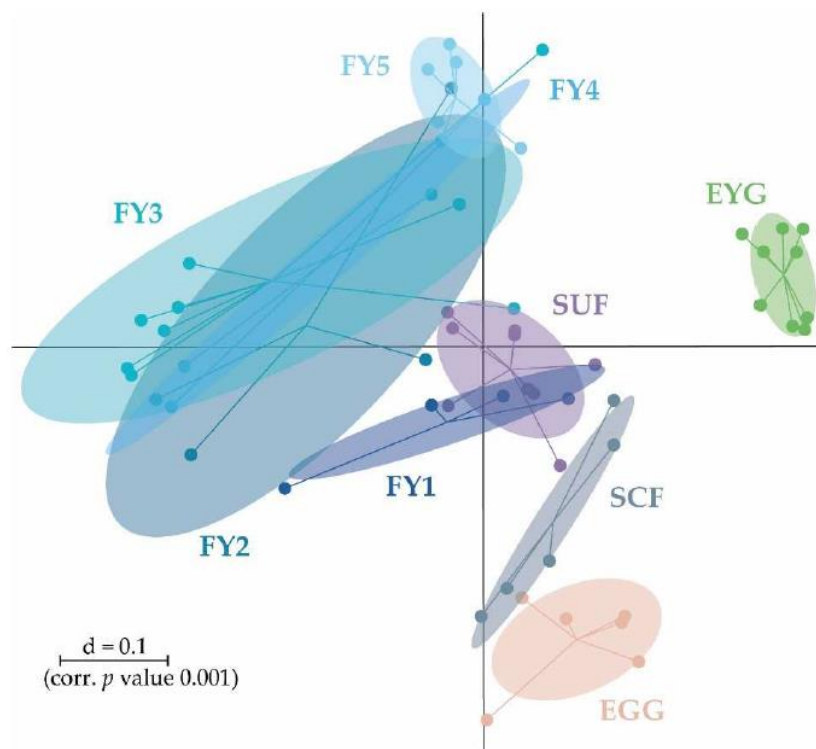
Sample	Read Count	Effective Richness
EGG (0 dpf)	20,392	51.2
EYG (35 dpf)	19,153	28.2
SCF (48 dpf)	3818	59.2
SUF (67 dpf)	12,610	28.2
FY1 (69 dpf)	6550	38.8
FY2 (74 dpf)	13,727	48.5
FY3 (82 dpf)	5720	48.9
FY4 (88 dpf)	8264	39.0
FY5 (95 dpf)	11,846	28.0

EGG, egg; EYG, eyed egg; SCF, sac fry; SUF, swim-up fry; FY, fry; dpf, days post fertilization.

Microbial profiles in the early developmental stages from EGG to SUF seemingly displayed distinct clusters separated from each other and the fry stages (FY1–FY5). The three earliest stages EGG, EYG, and SCF seemed to cluster farthest from the other developmental stages. The cluster of the later developmental stages (i.e., FY1–FY5) display a higher overlap and wider intra-group distribution. SUF and FY1, the stages collected just before and two days after the first feeding, might have an overlap due to the short time interval between sampling. In general, with the exception of EYG, consecutive stages clustered closest (Figure 2).



**Figure 1.**  $\alpha$ -diversity shown as effective richness (A) and Shannon effective diversity (B) of the different developmental stages of brown trout. Boxplots depict the median (thick bar), upper and lower quartile (within the box), and standard deviation (whiskers). Brackets above the individual boxplots indicate significance for pairwise comparison. Outliers are shown as dots. EGG, egg; EYG, eyed egg; SCF, sac fry; SUF, swim-up fry; FY1, fry 69 dpf; FY2, fry 74 dpf; FY3, fry 82 dpf; FY4, fry 88 dpf; FY5, fry 95 dpf; dpf, days post fertilization.  $p$  value summary: \*  $p \leq 0.05$ .

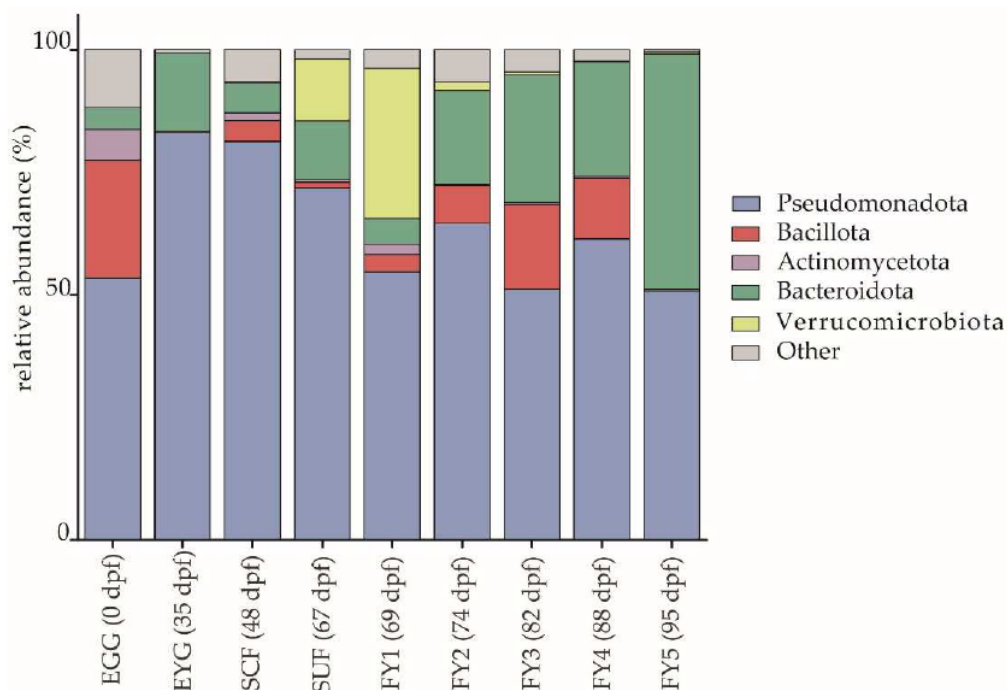


**Figure 2.**  $\beta$ -diversity of all samples shown as a multidimensional-scaling (MDS) plot. The scale is an indicator for the variation in the taxonomic makeup of microbiota between samples ( $\beta$ -diversity) based on generalized UniFrac distances ( $d = 0.1$  marks a 10% difference). EGG, egg; EYG, eyed egg; SCF, sac fry; SUF, swim-up fry; FY1, fry 69 dpf; FY2, fry 74 dpf; FY3, fry 82 dpf; FY4, fry 88 dpf; FY5, fry 95 dpf; dpf, days post fertilization.

### 3.1. Taxonomic Structure of Bacterial Communities (BC) of All Developmental Stages

#### 3.1.1. Description of the BC on Phylum Level

Pseudomonadota (formerly Proteobacteria) was the most abundant phylum in the BC of all developmental stages. The relative abundance varied between sampling times but always displayed a relative abundance of at least 50.0% (Figure 3). The different developmental stages displayed distinct changes even at the phylum level. These shifts were often caused by the increase or decrease of only one or a few families (e.g., Rubritaleaceae or Flavobacteriaceae). Bacteroidota (formerly Bacteroidetes) increased in the BC from the EGG to EYG stage, then alternated in the BC of SCF, SUF, and FY1 samples and strongly increased between FY2 and FY5. While Bacillota (previously Firmicutes) were highest in EGG samples, SCF ( $p \leq 0.05$  between EYG and SCF), SUF, and FY1 displayed lower relative abundances. Subsequently, Bacillota increased until FY3 ( $p \leq 0.05$  between EYG and FY3) and then decreased strongly until FY5. Interestingly, the phylum Verrucomicrobiota (formerly Verrucomicrobia) was observed at high abundances only in SUF (12.6%) and FY1 (30.6%), and at very low abundances (below 2.0%) in the FY2 and FY3 samples (Figure 3).

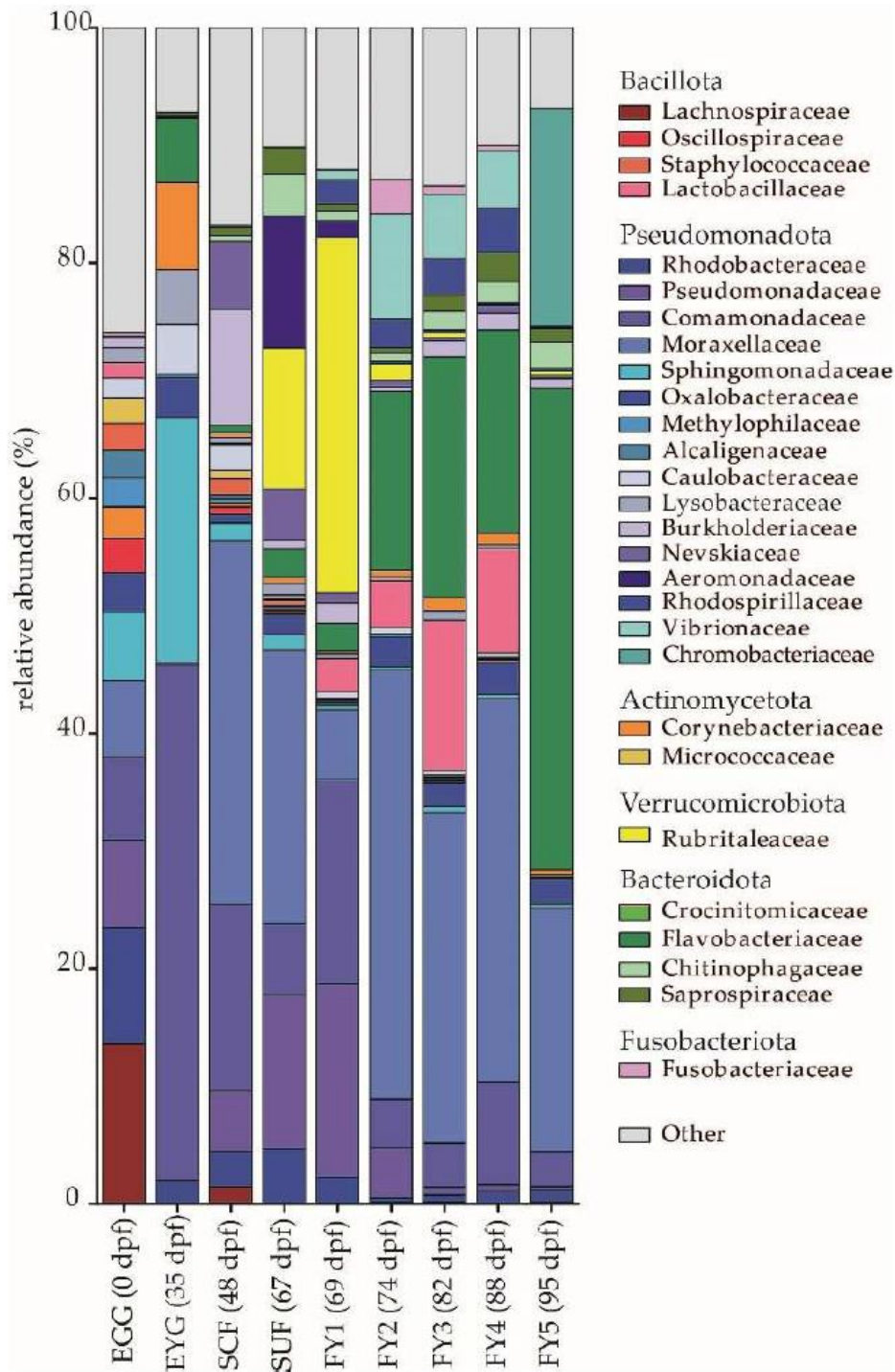


**Figure 3.** Relative abundances (%) of the five most abundant bacterial phyla in the BCs depicted for all stages. EGG, egg; EYG, eyed egg; SCF, sac fry; SUF, swim-up fry; FY1, fry 69 dpf; FY2, fry 74 dpf; FY3, fry 82 dpf; FY4, fry 88 dpf; FY5, fry 95 dpf; dpf, days post fertilization.

#### 3.1.2. Description of the BC on Family Level

At the family level, the most abundant families were either Moraxellaceae, Comamonadaceae, Rubritaleaceae, or Flavobacteriaceae (Figure 4), although these families were distributed unevenly in the different developmental stages. The strongest shifts in the family composition occurred in the early developmental stages (i.e., EGG, EYG, SCF, and SUF), while the later developmental stages displayed a more similar family composition and most changes were observed in regard to the abundances of different families.





**Figure 4.** Bacterial families with a relative abundance of 2.0% or higher in at least one stage in the BC shown for all developmental stages. EGG, egg; EYG, eyed egg; SCF, sac fry; SUF, swim-up fry; FY1, fry 69 dpf; FY2, fry 74 dpf; FY3, fry 82 dpf; FY4, fry 88 dpf; FY5, fry 95 dpf; dpf, days post fertilization.

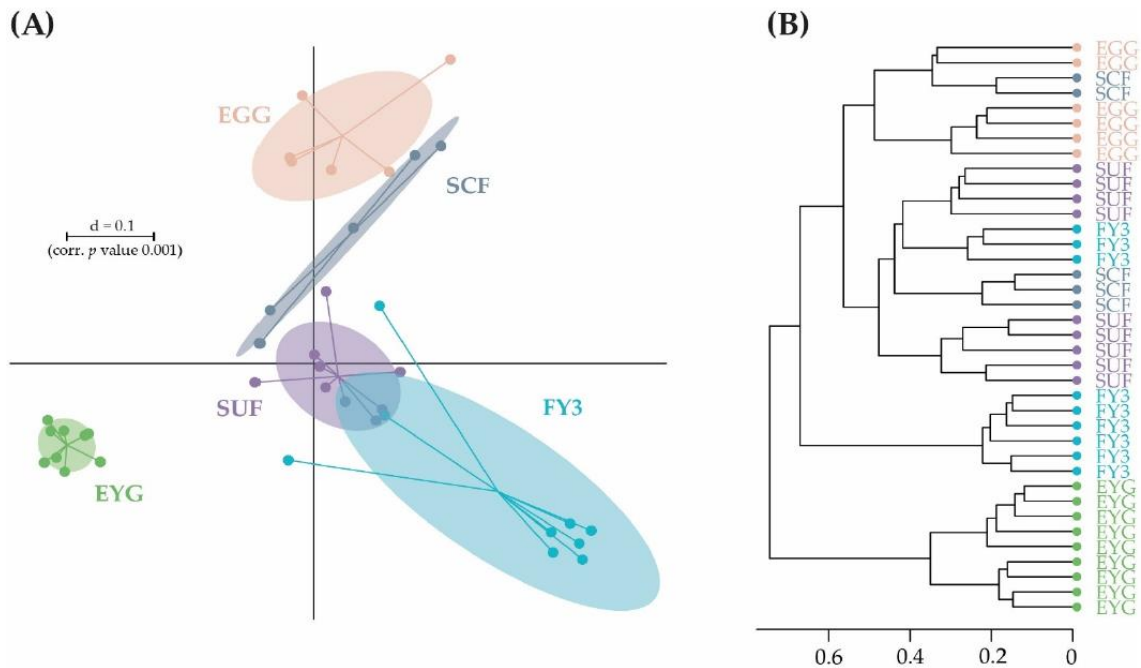
Interestingly, in the EGG samples, most of the occurring families were evenly represented. Here, the strongest family was Lachnospiraceae with a relative abundance of 13.6%, which could not be observed in any later stage. Following this, the families Rhodobacteraceae (9.9%), Pseudomonadaceae (7.4%), Comamonadaceae (7.1%), Moraxellaceae (6.5%), and Sphingomonadaceae (5.9%) were distributed evenly (Figure 4). Strong relative abundances of Lachnospiraceae explained the high number of the phylum Bacillota in the EGG stage, while in later stages high relative abundances of Bacillota mostly originated from the family Lactobacillaceae (i.e., FY2, FY3, and FY4). Further, the phylum Pseudomonadota

was composed of different and relatively evenly distributed families (Figure 4; families colored in shades of blue) in the EGG, while in most other stages two to three families with a high relative abundance and few other families with a low relative abundance formed the phylum Pseudomonadota. High relative abundances of the families Sphingomonadaceae (20.8%), Crocinitomicaceae (7.4%), and Lysobacteriaceae (4.6%) were unique for the EYG stage. Furthermore, the EYG samples displayed the second highest relative abundance of a singular family (Comamonadaceae, 43.8%; Figure 4). Besides the above-mentioned families, EYG contained Flavobacteriaceae (5.5%) with an abundance above 5.0%. Moraxellaceae showed a high abundance in the SCF (30.9%) for the first time and remained at a high level except for FY1 (5.9%). Moraxellaceae was followed in abundance by Comamonadaceae (15.9%), and Burkholderiaceae (9.8%; Figure 4). SUF contained the families Moraxellaceae (23.3%), Pseudomonadaceae (13.1%), Rubritaleaceae (12.0%), and Aeromonadaceae (11.3%) in decreasing order (Figure 4). In this stage, Comamonadaceae decreased to 6.0% of its relative abundance (Figure 4). In the BC of the FY1 stage, the family Rubritaleaceae dominated with 30.2% at family level. Thereafter, Comamonadaceae (17.4%), Pseudomonadaceae (16.5%), and Moraxellaceae (5.9%) appeared with an abundance above 5.0%. The high number of Rubritaleaceae in this stage explains the high abundance of the phylum Verrucomicrobiota (Figure 4). Between FY1 and FY2, a strong shift in the arrangement of the families was observed. FY2 was dominated by Moraxellaceae (36.5%) and Flavobacteriaceae (15.2%), while Vibrionaceae (9.0%) was observed for the first time to have abundances above 1.0%. Pseudomonadaceae (4.3%) belonged to the most abundant families in the previous two stages but displayed a strong descent in FY2. In subsequent stages, Pseudomonadaceae was observed in abundances below 0.5% only (Figure 4). The familial composition of FY3 was mostly comparable to FY2. However, after Moraxellaceae (28.1%) and Flavobacteriaceae (20.5%), in this stage Lactobacillaceae (12.8%) appeared, followed by Vibrionaceae (5.4%). Similarly, FY4 was dominated by Moraxellaceae (32.7%), Flavobacteriaceae (17.3%), and Lactobacillaceae (8.9%). Then, Comamonadaceae (8.7%) and Vibrionaceae (4.9%) followed (Figure 4). In the subsequent FY5 stage, sampled only seven days after the FY4 stage, the composition shifted strongly. FY5 was dominated by Flavobacteriaceae (41.0%), which doubled in relative abundance in only one week, while Moraxellaceae (20.8%) decreased to the extent of a third. Another highly abundant family, Chromobacteriaceae (18.5%), was observed to have abundances above 0.006% for the first time in this stage (Figure 4).

### 3.2. Bacterial Communities (BC) of the Early Developmental Stages from Egg to Swim-Up Fry

The early and the late developmental stages were analyzed separately. For once, during early ontogeny the fish undergoes stronger developmental change, i.e., hatching, consumption of the yolk, resorption of the yolk sac, and mouth opening. While in comparison between fry stages, developmental changes are characterized by growth and maturation only.

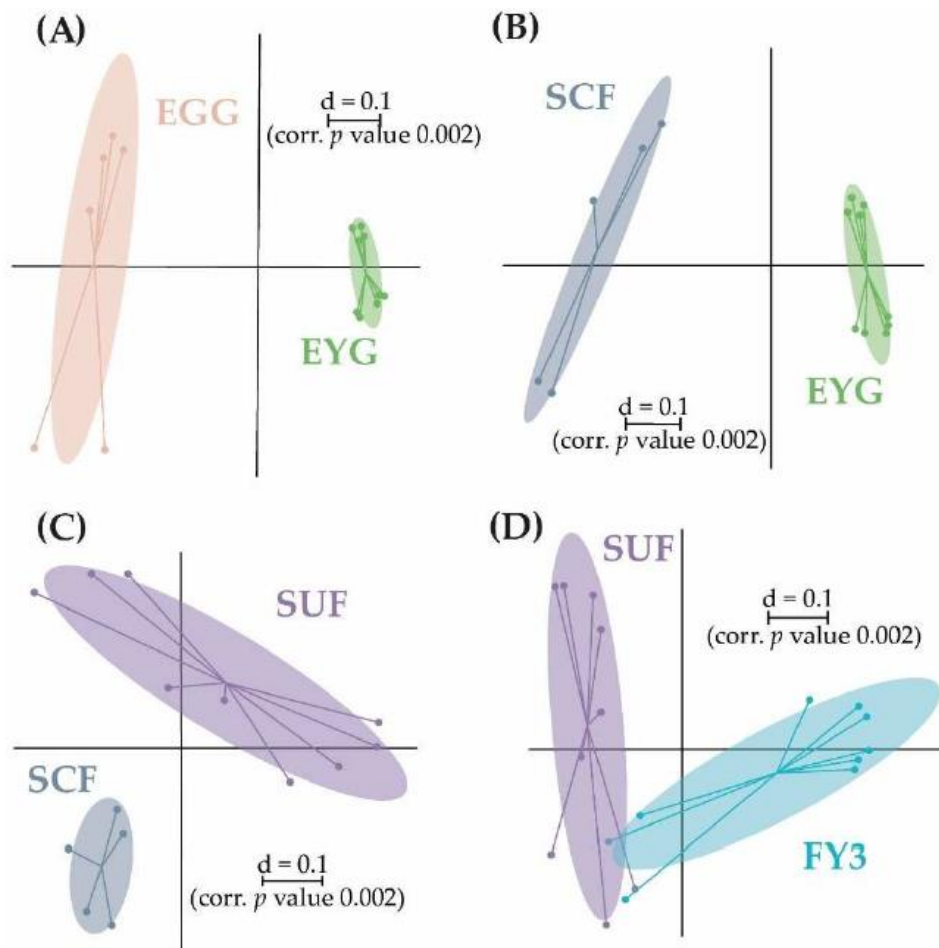
The early developmental stages (i.e., EGG, EYG, SCF, SUF, and FY3) are characterized by strong changes in fish ontogeny, which were reflected in distinct shifts in the fish's BC. The cluster of all stages, besides EYG, seemed closest to their preceding and subsequent sampling time point (Figure 5A). What was particularly striking was that the EYG clustered far away from the EGG and SCF, even though it is the intermediate stage. This is exceptionally clear in the dendrogram (Figure 5B). There was a significant difference between all the stages at the transition from one stage to the next (Figure 6). All developmental stages shared five families: Rhodobacteraceae, Comamonadaceae, Moraxellaceae, Lysobacteriaceae, and Burkholderiaceae (Figure 7A). Many families and zOTUs seemed to emerge at one point but increase or even decrease thereafter, while others were observed in the EGG stage BC only. In the following paragraph, each stage is compared with its successor describing the changes in BC over the course of development.



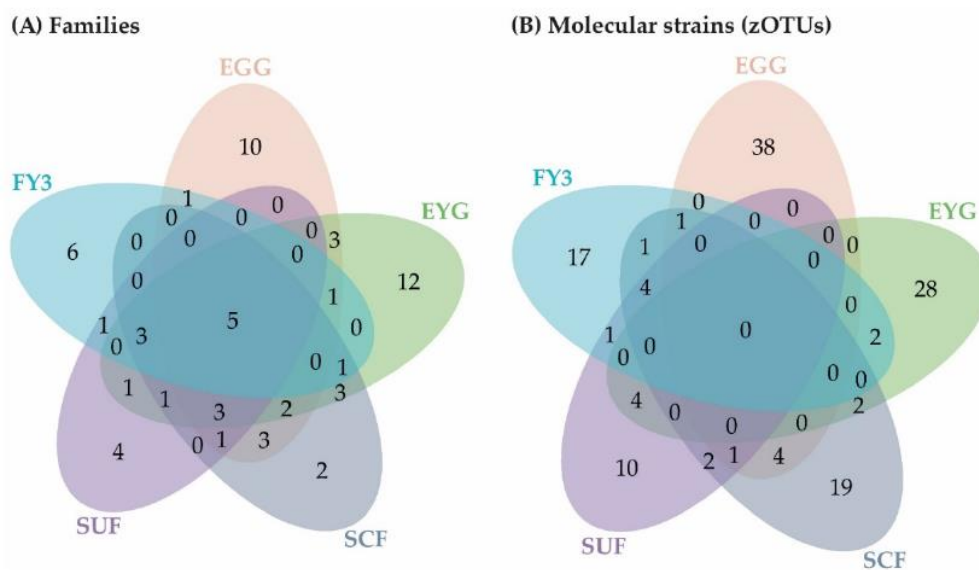
**Figure 5.** (A)  $\beta$ -diversity of early developmental stages. BC is shown as a multidimensional-scaling (MDS) plot. The scale is an indicator for the variation in the taxonomic makeup of microbiota between samples ( $\beta$ -diversity) based on generalized UniFrac distances ( $d = 0.1$  marks a 10% difference). (B) Dendrogram of samples from early developmental stages based on wards clustering method ( $d = 0.1$  marks a 10% difference). EGG, egg; EYG, eyed egg; SCF, sac fry; SUF, swim-up fry; FY3, fry 82 dpf; dpf, days post fertilization.

EGG and EYG stages are unhatched embryonal stages with a time difference of 35 days. Between the EGG's and EYG's BC, effective richness decreased significantly (Figure 1A). The microbial profiles of these two stages displayed clearly separated clusters that differed significantly (Figure 6A). Here, different EGG samples seemed to cluster wider than EYG samples. The families and the molecular strains that were unique for one stage or shared among different stages are displayed in a Venn diagram (Figure 7). Both stages shared 14 families with a relative abundance higher than 0.5% (EGG 29 families, EYG 35 families; Figure 7A). Of these shared families, significant differences between the families Comamonadaceae ( $p \leq 0.005$ ), Corynebacteriaceae ( $p \leq 0.05$ ), Lachnospiraceae ( $p \leq 0.05$ ), and Moraxellaceae ( $p \leq 0.05$ ) were observed. The absence of the families Alcaligenaceae ( $p \leq 0.05$ ), Crocinitomicaceae ( $p \leq 0.05$ ), Flavobacteriaceae ( $p \leq 0.001$ ), Micrococcaceae ( $p \leq 0.05$ ), Staphylococcaceae ( $p \leq 0.05$ ), Streptococcaceae ( $p \leq 0.05$ ), and Pseudomonadaceae ( $p \leq 0.01$ ) was significant. Interestingly, EYG's BC consisted of 35 families, but only 36 zOTUs, whereas the EGG's BC consisted of 29 families and 44 zOTUs (Figure 7B). While there have been overlaps at the family level, no zOTUs were shared between these two stages (Figure 7B). On that account, significances at the zOTU level only arose due to the absence of species in either EGG or EYG (zOTU 20, *Hydrogenophaga taeniospiralis* with 99.8% similarity; zOTU 21, *Moraxella osloensis* with 100% similarity; zOTU 22, *Flavobacterium ureilyticum* with 99.8% similarity; zOTU 24, *Paucibacter oligotrophus* with 98.6% similarity; zOTU 39, *Curvibacter lanceolatus* with 97.7% similarity; zOTU 54, *Methylophilus quaylei* with 97.3% similarity; zOTU 72, *Alcaligenes aquatilis* with 99.5% similarity; and zOTU 81, *Rhizobacter profundi* with 99.5% similarity), while zOTU 3 (*Chakrabartia* species with 100% similarity) was significant due to its low abundance in EGG compared to EYG (Figure 8).

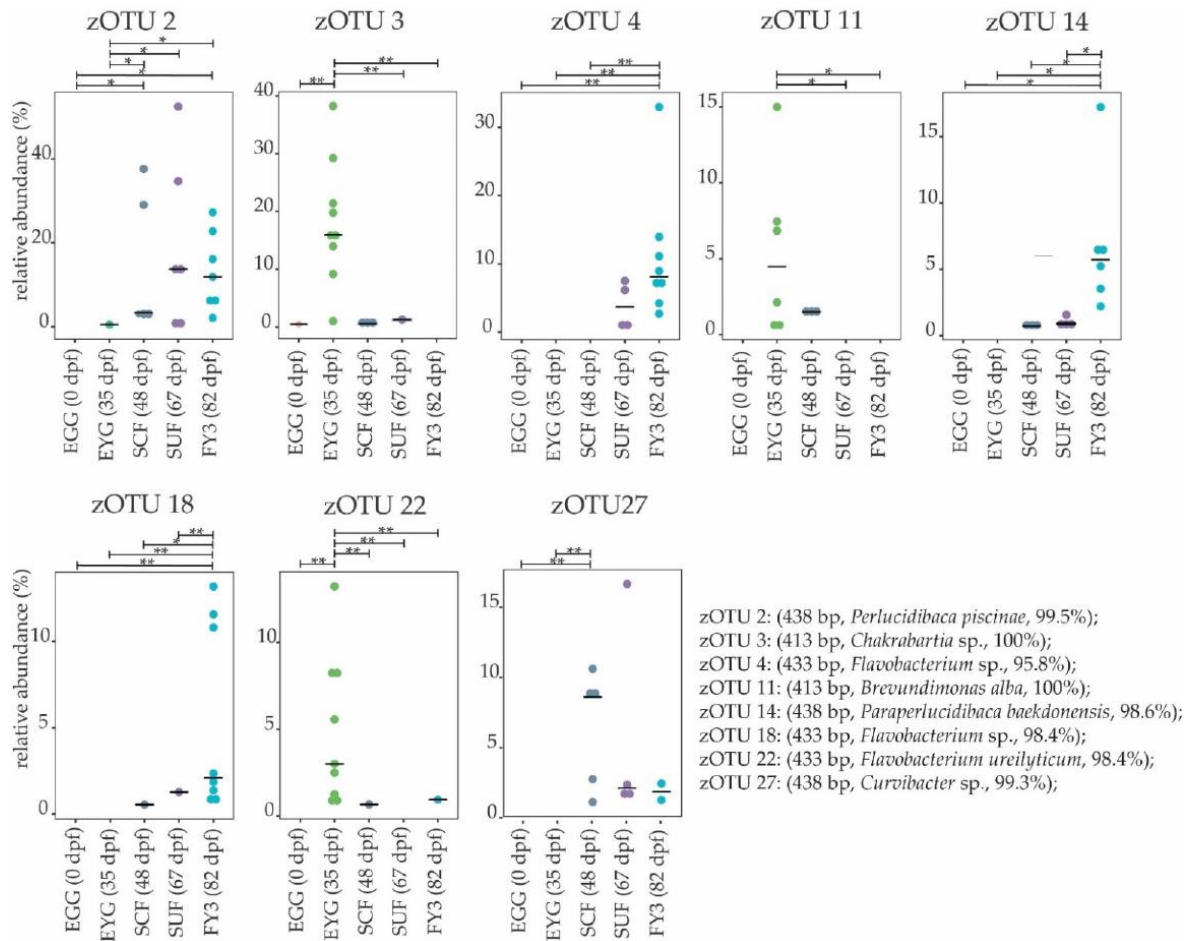




**Figure 6.** Pairwise  $\beta$ -diversity of the BC of the early developmental stages displayed as a multidimensional-scaling (MDS) plots. The scale is an indicator for the differences in the taxonomic makeup of microbiota between samples ( $\beta$ -diversity) based on generalized UniFrac distances ( $d = 0.1$  marks a 10% difference). Pairwise  $\beta$ -diversity between EGG and EYG (A); EYG and SCF (B); SCF and SUF (C); SUF and FY3 (D). EGG, egg; EYG, eyed egg; SCF, sac fry; SUF, swim-up fry; FY3, fry 82 dpf; dpf, days post fertilization.



**Figure 7.** Venn diagram depicting unique and shared families (A) and molecular strains (zOTUs) (B) among the early developmental stages (EGG-SUF) and FY3 (cut-off: 0.5% mean relative abundance in the BC of each stage). EGG, egg; EYG, eyed egg; SCF, sac fry; SUF, swim-up fry; FY3, fry 82 dpf; dpf, days post fertilization.



**Figure 8.** Molecular strains in the early developmental stages are shown. Boxplots depict the median (thick bar) and individual samples (points). Brackets above the individual boxplots indicate the significance level for pairwise comparison. zOTUs were identified by EzBioCloud; the sequence length, the closest relative taxon, and the sequence similarity score of zOTUs are shown in the order of appearance. EGG, egg; EYG, eyed egg; SCF, sac fry; SUF, swim-up fry; FY3, fry 82 dpf; dpf, days post fertilization.  $p$  value summary: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

After the embryonal stages EGG and EYG, the SCF hatch. This stage is characterized by a closed mouth and the presence of a yolk sac. In comparison to the embryonal stage, where only the egg's surface is exposed to the environment, in the sac fry stage the fish's mucosa is in direct contact with the environment.

The effective richness increased significantly between EYG and SCF (Figure 1A). Microbial profiles of SCF displayed a more heterogenous cluster than EYG and both stages differed significantly in their  $\beta$ -diversity (Figure 6B). With a relative abundance of at least 0.5%, EYG contained 35 families and SCF 24 different families. These stages shared the highest number of families between all early developmental stages with 18 families (Figure 7A). Of these shared families, Comamonadaceae ( $p \leq 0.005$ ), Lachnospiraceae ( $p \leq 0.05$ ), and Moraxellaceae ( $p \leq 0.05$ ) differed significantly, while the absence of the families Burkholderiaceae ( $p \leq 0.005$ ), Flavobacteriaceae ( $p \leq 0.05$ ), Nevskiaceae ( $p \leq 0.005$ ), Pseudomonadaceae ( $p \leq 0.005$ ), and a family of the order Saprospirales ( $p \leq 0.005$ ) was statistically significant. Both stages displayed nearly the same number of zOTUs (EYG: 36; SCF: 34), whereby, they shared two zOTUs only (Figure 7B). As in



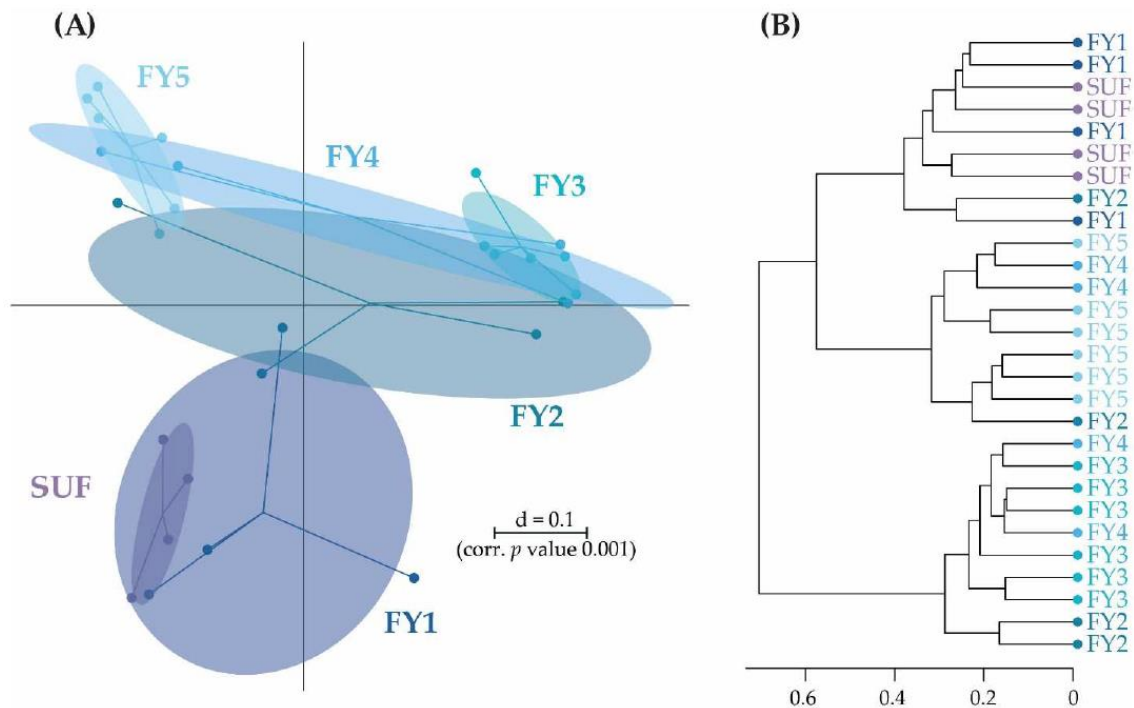
the previous comparison, significant differences at the zOTU level were observed due to either the absence of a molecular strain (zOTU 20, *Hydrogenophaga taeniospiralis* with 99.8% similarity; zOTU 22, *Flavobacterium ureilyticum* with 99.8% similarity; zOTU 27, *Curvibacter* species with 99.3% similarity; zOTU 39, *Curvibacter lanceolatus* with 97.7% similarity; zOTU 49, *Limnobacter thiooxidans* with 100% similarity; zOTU 110, *Perlucidibaca piscinae* with 98.9% similarity; zOTU 119, *Agitococcus lubricus* with 96.5% similarity; zOTU 165, *Stagnimonas* species with 98.9% similarity; and zOTU 174, *Brevundimonas* species with 99.8% similarity) or a very low number of samples containing zOTU 2 (*Perlucidibaca piscinae* with 99.5% similarity; Figure 8). Many molecular strains appeared only in the EYG, examples named here appeared with a mean relative abundance of over 1.0% in at least 50% of the samples: zOTU 20 and zOTU 23 (both *Hydrogenophaga taeniospiralis* with 99.8% similarity), zOTU 24 (*Paucibacter digotrophus* with 98.6% similarity), zOTU 34 (*Rhodiferax aquaticus* with 99.3% similarity), zOTU 50 (*Rhodiferax* species with 98.4% similarity), zOTU 62 (*Rhodiferax bucti* with 99.3% similarity), and zOTU 82 (*Rhizobacter profundi* with 99.5% similarity).

The stage succeeding SUF is characterized by the complete absorption of the remaining yolk sac, the opening of the mouth, and thus probably the main colonization of the gastrointestinal tract. Further, the swim-up fry must rise to the water's surface to fill the swim bladder with air. The effective richness decreased significantly until SCF (Figure 1A). Microbial profiles of these samples displayed a strong heterogeneity, clustered remotely with no overlaps, and differed significantly in both groups (Figure 6C). Both stages' BC displayed a similar number of families with an abundance stronger than 0.5% (SCF: 24 and SUF: 19), of which they shared over 50% of families (i.e., 13 families; Figure 7A). Of these families, an unknown family in the order Saprospirales was significantly higher in SCF ( $p \leq 0.01$ ), while the absence of Lachnospiraceae in SUF was also significant ( $p \leq 0.05$ ). At the molecular strain level, SCF's BC consisted of 34 molecular strains with an abundance of at least 0.5%, while SUF's BC consisted of only 22 zOTUs (Figure 7B). The two groups shared seven zOTUs (Figure 7A) and no significant differences on zOTU level were observed. The molecular strains zOTU 63 (*Aquirhabdus parva* with 97.5% similarity), zOTU 114 (*Rhizobacter profundi* with 98.4% similarity), zOTU 119 (*Agitococcus lubricus* with 96.5% similarity), zOTU 161 (*Pseudomonas atagonensis* with 99.5% similarity), and zOTU 175 (*Nevskia ramosa* with 97.9% similarity) were only observed in SCF.

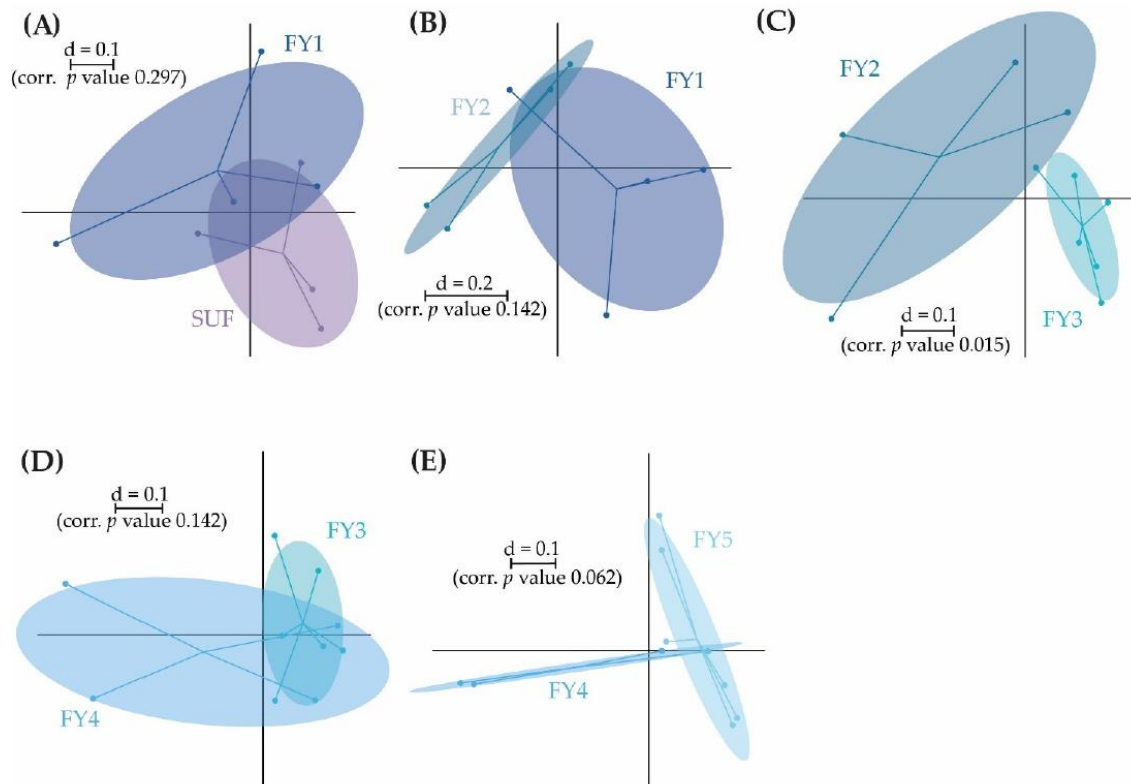
We then compared SUF with FY3, as the time frame of two weeks between sampling of those stages was most comparable to the other time frames in the early developmental stages. Further, subsequent fry stages' BC seemed to change in a non-physiological way, thus direct comparison was omitted. FY3 stage is a fry stage that had already been start-feed on 67 dpf and is thus already influenced by the feed's impacts for 15 days. Between SUF and FY3, bacterial diversity increased, however, not significantly (Figure 1). Both stages' samples displayed a strong heterogeneity in their ecological profiles and seemingly overlapped for some samples. Nevertheless, the two groups differed significantly in their microbial profiles (Figure 6D). SUF and FY3 stages showed nearly the same number of families; 19 and 18 families in SUF and FY3, respectively, and shared nine families (Figure 7A). Two families that were not shared between these stages were statistically significant, Clostridiaceae ( $p \leq 0.05$ ) and Vibrionaceae ( $p \leq 0.05$ ). The shared families, Flavobacteriaceae ( $p \leq 0.05$ ), Pseudomonadaceae ( $p \leq 0.05$ ), Rhodospirillaceae ( $p \leq 0.05$ ), and Streptococcaceae ( $p \leq 0.05$ ) displayed significant differences. The BC of SUF enclosed 22 zOTUs and the BC of FY3 26 zOTUs, whereby both stages shared five zOTUs (Figure 7B). Of these shared molecular strains, zOTU 14 (*Paraperlucidibaca baekdonensis* with 98.6% similarity), zOTU 18 (*Flavobacterium* species with 98.4% similarity) (Figure 8), zOTU 30 (*Aquirhabdus parva* with 100% similarity), and zOTU 77 (*Agitococcus* species with 97.3% similarity) were significantly different. The absence of zOTU 46 (*Ligilactobacillus salivarius* with 100% similarity), zOTU 51 (*Weissella cibaria* with 100% similarity), zOTU 70 (*Photobacterium phosphoreum* with 100% similarity), and zOTU 157 (*Ligilactobacillus salivarius* with 99.77% similarity) in one of these stages' BC was statistically significant.

### 3.3. Bacterial Communities (BC) of the Late Developmental Stages from Swim-Up Fry to Fry

The following stages are fry stages (FY1–FY5; 69–95 dpf) that had been start-fed on 67 dpf. Here, line B provided insufficient sample numbers, thus, the following fry stages presented were derived only from line A. In these stages, only moderate differences in the BC between the subsequent stages were observed. The fry stages displayed fewer distinct shifts in their BC than the early developmental stages and higher consistency among the different stages (Figures 9 and 10). All late developmental stages shared five families: Comamonadaceae, Moraxellaceae, Flavobacteriaceae, Alteromonadaceae, and Chitinophagaceae. In addition, five molecular strains occurred in all fry stages (zOTU 2, *Perluclidibaca piscinae* with 100% similarity; zOTU 4, *Flavobacterium* species with 95.84% similarity; zOTU 14, *Paraperluclidibaca baekdonensis* with 98.6% similarity; zOTU 27, *Curvibacter* species with 99.3% similarity; and zOTU 38, Chitinophagaceae with 95.84% similarity). The BC of the later developmental stages displayed fewer distinct clusters than the stages from EGG to SUF (Figure 2). SUF and FY1 BC were separated only by a time interval of two days (i.e., 67 dpf and 69 dpf) and feeding started on 67 dpf after the sampling. These two groups clustered variously on a separate branch of the sample similarity tree (Figure 9B). FY3 and FY5 samples split on different branches (Figure 9B; lower two branches). While FY2 samples were present in all three branches, FY4 samples split between lower two branches (Figure 9B).



**Figure 9.** (A)  $\beta$ -diversity of late developmental stages' BC is shown as a multidimensional-scaling (MDS) plot. The scale is an indicator for the variation in the taxonomic makeup of microbiota between samples ( $\beta$ -diversity) based on generalized UniFrac distances ( $d = 0.1$  marks a 10% difference). (B) Dendrogram of samples from early developmental stages based on ward's clustering method ( $d = 0.1$  marks a 10% difference). SUF, swim-up fry; FY1, fry 69 dpf; FY2, fry 74 dpf; FY3, fry 82 dpf; FY4, fry 88 dpf; FY5, fry 95 dpf; dpf, days post fertilization.

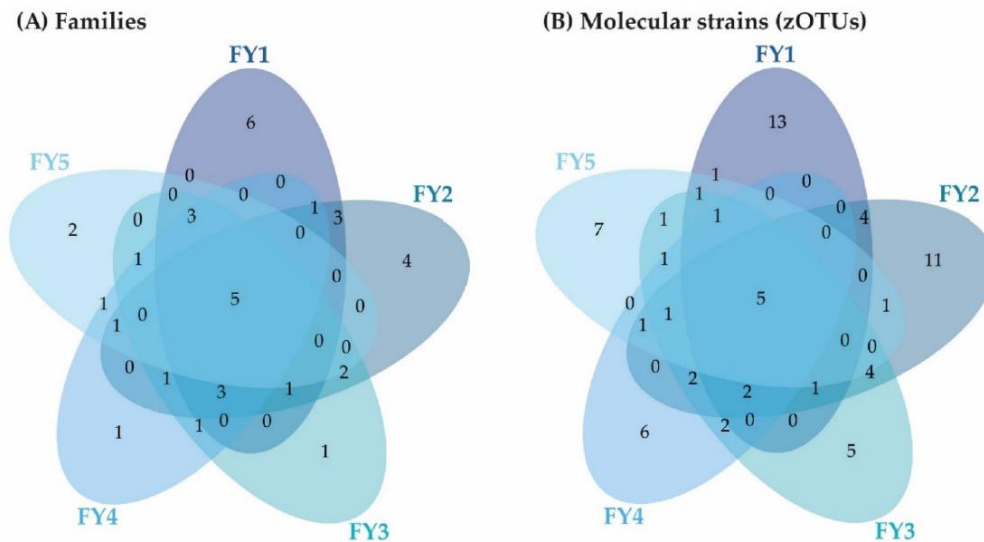


**Figure 10.** Pairwise  $\beta$ -diversity of the fry stages and SUF displayed as a multidimensional-scaling (MDS) plots. The scale is an indicator for the differences in the taxonomic makeup of microbiota between samples ( $\beta$ -diversity) based on generalized UniFrac distances ( $d = 0.1$  marks a 10% difference). Pairwise  $\beta$ -diversity between SUF and FY1 (A); FY1 and FY2 (B); FY2 and FY3 (C); FY3 and FY4 (D); FY4 and FY5 (E). SUF, swim-up fry; FY1, fry 69 dpf; FY2, fry 74 dpf; FY3, fry 82 dpf; FY4, fry 88 dpf; FY5, fry 95 dpf; dpf, days post fertilization.

For the early developmental stages, the time frame between sampling was around 14 days, based on the duration of the different developmental stages. Allowing a better comparison of the data, differences between late developmental stages were first displayed for every second sampling timepoint

The effective richness and effective Shannon diversity increased between FY1 and FY3. Yet, this increase was not significant (Figure 1). There was no significant difference in the ecological profiles between FY1 and FY3 ( $p = 0.13$ ), and both groups' clusters apparently overlapped. On the dendrogram, the two stages clustered on different branches (Figure 9B). While FY1 was dominated by the families Rubritaleaceae, Comamonadaceae, and Pseudomonadaceae, FY3 showed higher abundances of Moraxellaceae, Lactobacillaceae, and Flavobacteriaceae. The family Rubritaleaceae vanished completely in FY3. In total, FY1 was composed of 22 families with an abundance above 0.5%, and FY3 of 18 families. Both stages shared twelve families (Figure 11A) and the absence of the family Clostridiaceae ( $p \leq 0.05$ ) in FY1 was significant. At the molecular strain level, FY1 was composed of 28 zOTUs with an abundance above 0.5% and FY3 of 26 zOTUs. Both stages shared ten zOTUs (Figure 11B). Significant differences at the molecular strain level have been observed for zOTU 46 (*Ligilactobacillus salivarius* with 100% similarity), zOTU 70 (*Photobacterium phosphoreum* with 100% similarity), and zOTU 157 (*Ligilactobacillus salivarius* with 99.8% similarity).

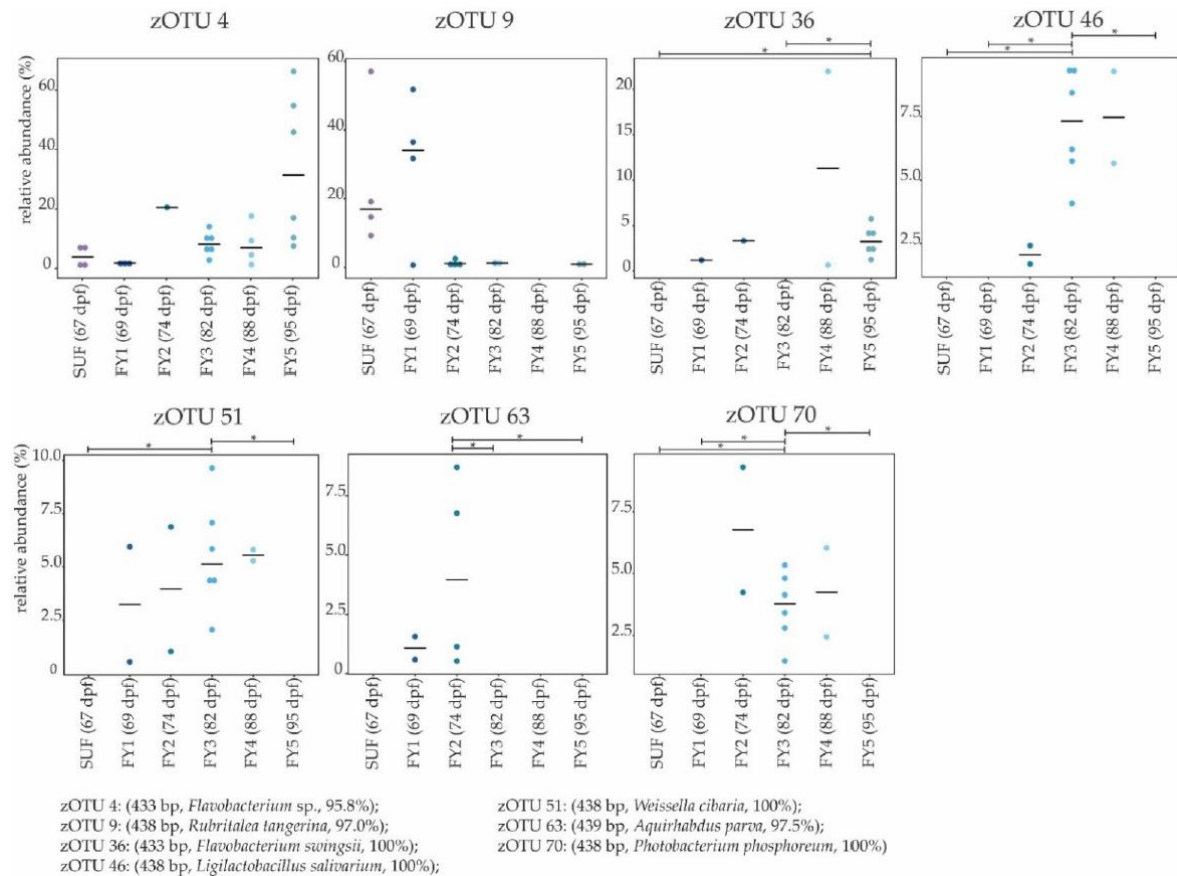




**Figure 11.** Venn diagram depicting unique and shared families (A) and molecular strains (zOTUs) (B) among the fry stages (FY1–FY5; cut-off: 0.5% mean relative abundance). FY1, fry 69 dpf; FY2, fry 74 dpf; FY3, fry 82 dpf; FY4, fry 88 dpf; FY5, fry 95 dpf; dpf, days post fertilization.

FY3 displayed a high effective richness, while a strong drop in abundance occurred thereafter. We further describe changes between these two stages. Comparing FY3 and FY5, the effective richness and Shannon effective diversity differed significantly (Figure 1). The ecological profiles of both stages' BC showed a small overlap and differed significantly ( $p \leq 0.05$ ). On the dendrogram, the two stages clustered on different branches (Figure 9B). As described above, FY3 was dominated by the families Moraxellaceae, Flavobacteriaceae, and Lactobacillaceae, in descending order, while FY5 was dominated by the families Flavobacteriaceae, Moraxellaceae, and Chromobacteriaceae (Figure 4). FY3 consisted of 18 families, whereas FY5 consisted of only 13 families. Both stages shared nine families with an abundance above 0.5% (Figure 11A). The absence was significant for Clostridiaceae ( $p \leq 0.05$ ), Lactobacillaceae ( $p \leq 0.05$ ), Streptococcaceae ( $p \leq 0.05$ ), and Vibrionaceae ( $p \leq 0.05$ ), while Rhodospirillaceae was significantly lower in FY3 ( $p \leq 0.05$ ). In total, 26 zOTUs with a relative abundance above 0.5% were observed for FY3 and for FY5 a total of 20 zOTUs were observed (Figure 11B). At the molecular strain level, the absence of a zOTU in either FY3 or FY5 was significant for zOTU 36 (*Flavobacterium swingsii* with 100% similarity), zOTU 46 (*Ligilactobacillus salivarius* with 100% similarity), zOTU 51 (*Weissella cibaria* with 100% similarity), zOTU 70 (*Photobacterium phosphoreum* with 100% similarity), and zOTU 157 (*Ligilactobacillus salivarius* with 99.8% similarity; Figure 12).

In the following paragraphs, the time interval between sampling time points will be reduced again, comparing every stage with its successor. After FY1 differences occur, we only regard the growth and maturation of the fish.



**Figure 12.** Molecular strains in the fry stages (FY1–FY5) and SUF; Boxplots depict the median (thick bar) and individual samples (points). Brackets above the individual boxplots indicate the significance level for pairwise comparison. zOTUs were identified by EzBiocloud; the sequence length, the closest relative taxon, and the sequence identity score of zOTUs are shown in the order of appearance. SUF, swim-up fry; FY1, fry 69 dpf; FY2, fry 74 dpf; FY3, fry 82 dpf; FY4, fry 88 dpf; FY5, fry 95 dpf; dpf, days post fertilization.  $P$  value summary: \*  $p \leq 0.05$ .

When comparing the latest early developmental stage (i.e., SUF) with the following stage that is already part of the late developmental stages (i.e., FY1), bacterial diversity remained almost constant (Figure 1). The ecological profiles of these two stages were similar and did not differ significantly. The clusters of SUF and FY1 overlapped in half of the samples (Figure 10A). This close proximity can be seen exceptionally well on the dendrogram where all of these stages' samples are clustered on one branch (Figure 9B). SUF's BC consisted of 19 families with an abundance higher than 0.5%, while FY1's BC contained 22 families (Figure 11A). The absence of Rhodospirillaceae in SUF was significant ( $p \leq 0.05$ ). SUF's BC consisted of 22 zOTUs, while FY1's BC of 28 zOTUs (Figure 11B). No significant differences at the zOTU level were observed.

Between FY1 and FY2 BC, bacterial diversity increased without differing significantly (Figure 1). The samples of these two stages' ecological profiles displayed overlapping clusters and were not significantly different (Figure 10B). Nevertheless, they clustered on different branches of the dendrogram (Figure 9B). In the Venn diagram, the families and the molecular strains (zOTUs) that were unique for one stage or shared among two or more developmental stages are shown (Figure 11A,B). At the family level, FY1's BC consisted of 22 families and FY2's BC of 21 families with a relative abundance of 0.5%

or higher. The two stages' BC shared 13 families (Figure 11A). None of the families observed differed significantly between FY1 and FY2. FY1 contained 28 zOTUs, while FY2 32 zOTUs (Figure 11B). Both stages' BC shared 12 molecular strains, while no zOTU differed significantly.

Between the BC of FY2 and FY3, the effective richness was comparable (Figure 1A), while the microbial profiles differed significantly (Figure 9C). The BC of the stages FY2 and FY3 contained 21 and 18 families, respectively, and shared 14 families (Figure 11A). No families differed significantly between those two stages. At the molecular strain level, FY2 consisted of 32 zOTUs and FY3 consisted of 26 zOTUs (Figure 11B). These two stages shared 15 zOTUs, however, the absence of zOTU 63 (*Aquirhabdus parva* with 97.5% similarity) in FY3 and the absence of zOTU 157 (*Ligilactobacillus salivarius* with 99.8% similarity) in FY2 was significant ( $p \leq 0.05$ ; Figure 12).

When comparing FY3 with FY4, a subtle decrease of the bacterial diversity was observed (Figure 1). The two groups displayed overlapping clusters in the multidimensional-scaling plot (Figure 10D) and the proximity of overlapping samples could be seen exceptionally well in the dendrogram (Figure 9B). Hence,  $\beta$ -diversity displayed no significant difference (Figure 10D). FY3 still contained 18 families as did FY4, of which the two groups shared 15 families (Figure 11A). FY3 contained 26 and FY4 21 zOTUs, of which both groups shared 14 zOTUs (Figure 11B). No significant differences have been observed at either family or zOTU level.

Looking at FY4 and FY5,  $\alpha$ -diversity displayed no significant difference. Nonetheless, effective richness and Shannon effective diversity decreased (Figure 1). The ecological profiles of these two groups displayed no significant difference ( $p = 0.062$ ; Figure 10D), overlapped slightly; while half of the FY4 samples clustered on another branch than FY5 samples (Figure 9B). In general, FY5 samples seemed very homogenous in both the multidimensional-scaling plot and the dendrogram (Figure 9). While FY4 still had 18 families, the count decreased to 13 families in FY5 BC (Figure 11A). Both stages shared eleven families. The growing difference between the two stages was observed in the diversity (Figure 10E) and the decrease of shared families to only eleven counts (Figure 11A). At zOTU level, FY4's BC consisted of 21, while FY5's BC of 20 zOTUs, of which they shared nine zOTUs (Figure 11B). No significant differences were found between families and zOTU.

Summarizing all results, the changes during early development were larger than the changes during the late developmental stages. The richness varied between the BC of stages EGG, EYG, and SCF, then increased until FY3 and dropped until the last sampling in FY5.  $\beta$ -diversity changed significantly in successor stages in the early development, while in the late developmental stages no significance differences occurred, with the exception of FY2 to FY3. All stages' BC were dominated by Pseudomonadota at the phylum level. In EGG, several families displayed similarly high abundances, while the later developmental stages were dominated by one or two families each. However, these families changed over time, with Moraxellaceae being the family that dominated most stages' BC.

#### 4. Discussion

In the present study, we investigated the ontogenetic development in the BC of brown trout in different developmental stages from unfertilized egg to fry. To the best of our knowledge, this is the first study using 16S gene amplicon rRNA sequencing for assessing the microbiota in brown trout during ontogeny. The study was conducted in a fish farm run as a commercial aquaculture, to provide a realistic representation of the BC under commercial farming conditions. The handling in a commercial fish farm seemed to have no influence on data quality and especially no contamination has been detected in the samples. The sampling of the complete fish resulted in a high amount of host DNA during DNA extraction and library preparation, and probably subsequent partial inhibition of the end product in several samples, thus some single samples had to be excluded.

Results from this work showed that during early development (i.e., 0 to 67 dpf) the BC of the complete fish changed strongly between the stages regarding the effective richness,



family, and even phylum composition. These strong shifts are consistent with other studies in salmonids [27,59]. Nevertheless, there is a lack of knowledge regarding the ontogenetic development of different fish species and its influence on the fish's health. Similar to the findings in the brown trout's eggs sampled in this study (i.e., EGG and EYG), other authors described a diverse BC [60,61] dominated by the phylum Pseudomonadota in the embryonal stages [18,27,62,63]. Wilkins et al. (2016) [18] showed that in brown trout eggs' BC, the maternal influence was negligible, whereas the fraternal impact and bacterial nutrient availability displayed the strongest effects. The high abundance of Lachnospiraceae in the unfertilized egg found in our study has not been described elsewhere, although most other studies described fertilized eggs only. Interestingly, we found a lower bacterial diversity in the EYG stage compared to the EGG stage. Wilkins et al. (2015) reported a decrease in  $\alpha$ -diversity from early to late embryos in whitefish (*Coregonus* species) whereby the eggs were fertilized and the eyed eggs were sampled at a later time point than in the present study [64]. It has been suggested that the surface of eggs is rich in bacterial substrate [25,26,65], therefore, bacteria might colonize the early chorion stages in higher abundances, while bacterial diversity decreases in later egg stages as nutrients on the egg surface decrease [66]. Whether the diversity decreased until the late embryonic stage and increased immediately in the SCF stage remains unknown due to the lack of sampling just before hatching. When eggs were fertilized and started developing (i.e., EYG 35 dpf), the ecological profiles differed strongly from all other samples (Figures 8 and 10). Even though different spawners and milters were combined, the variations between different parent animals could not be traced at 35 dpf and all EYG samples showed a similar BC that strongly differed from all other tested stages. In fertilized eggs from channel catfish (*Ictalurus punctatus*), brown trout, and ballan wrasse (*Labrus bergylta*), the BC was described to be influenced by the holding tanks, genetics, and egg disinfection [18,62,67]. Furthermore, for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*), an influence of sampling site, species, and sampling type on the BC of eggs and water have been described [63]. In a study by Najafpour et al. (2021) [63], gilthead seabream's BC from a certain sampling place displayed high abundances of the genus *Psychrobium*, while for European seabass's a high abundances of the genus *Cyanobacteria* was typical for a certain location. Other studies described Flavobacteriaceae as a site-specific family [18,62,63], while Rhodobacteraceae is suggested to be an important environmental-associated family that is found often on fertilized eggs [63,68,69]. In the present study, the most common families in EYG were Comamonadaceae, Sphingomonadaceae, Corynebacteraceae, and Flavobacteriaceae in descending order (Figure 4), and further, Comamonadaceae was mostly composed of the genera *Rhodoferrax* (14.6%), *Hydrogenophaga* (9.6%), and *Paucibacter* (5.1%). At the molecular strain level, in descending order, the most abundant strains of these genera were zOTU 24 (*Paucibacter oligotrophus* with 98.6% similarity), associated with freshwater [70], zOTU 20 and 23 (both *Hydrogenophaga taeniospiralis* with 99.8% and 100% similarity, respectively), which has been first isolated from soil [71], and zOTU 16 (*Rhodoferrax bucti* with 98.6% similarity), isolated from freshwater [72]. This finding supports the theory of an environmentally associated BC. Further, the family Sphingomonadaceae (mostly genus *Chakrabartia*; 19.2%) with its molecular strain zOTU 3 (*Chakrabartia* species with 100% similarity to Cr-cl17 (DQ295907)) is most probably associated with water, as the strain Cr-cl17 has been isolated from backwash water in Germany [73]. Comparison of embryonal stages' BC to different studies is hardly possible, as early life BCs in fish are suggested to be species and stage-specific [74]. In general, knowledge of the BC in early developmental stages and even before the hatching is important as shifts or differences in the BC in these embryonal stages might be associated with higher embryonal mortality and a longer time until hatching [18], however, this association has not been tested in this work.

The hatching of the sac fry larvae exposed the fish and the mucosal organs for the first time to the environment and its BC [75–77]. This encounter and the following colonization of the sac fry with microorganisms might play an important role in the development of mucosal organs and the immune system of the fish [78–80]. Further, prior to hatching,

oxygen is taken up by cutaneous breathing, which changes with hatching to pharyngeal oxygen uptake and could affect the BC [81]. Compared to the previous EYG stage, the SCF stage displayed a vastly different BC with the highest abundance of all sampled stages composed of the families Moraxellaceae, Comamonadaceae, Burkholderiaceae, and Nevskiaceae, in descending order. A strong difference between eggs and hatched larvae has been described by other authors as well [27]. Additionally, the higher richness of pre-feeding larvae and the strongest difference to most other stages has been described before [82]. Nikouli et al. (2019) [83] described sac fry stages' BC to be highly comparable to the BC of the rearing water. This might arise from osmoregulation processes in larvae before mouth opening [74,84]. In this work, SCF stages have been dominated by the molecular strains zOTU 2 (*Perlucidibaca piscinae* with 99.5% similarity), associated with freshwater [85], and zOTU 49 (*Limnobacter thiooxidans* with 100% similarity) associated with freshwater lake sediment from the Chiemsee in Germany [86]. Further dominant strains were zOTU 27 (*Curvibacter* species with 99.3% similarity) with the top hit strain PAE-UM (accession KQ483358) that has been isolated from river sediment and zOTU 119 (*Agitococcus lubricus* with 96.5% similarity) isolated from fresh water [87]. These findings not only support the work from Nikouli et al. (2019) [83] but further support the theory that BC from sac fry larvae is associated with the surrounding water and environment.

When all nutrients in the yolk sack are consumed, the fish starts orally consuming feed. In this study, the swim-up fry stage (i.e., SUF) was sampled before first feeding. Therefore, in this stage, feed and feed-associated microbiota have not yet influenced the fry. However, even though the SUF has not been start-fed and no changes in the environment occurred, we currently assume that changes might be either due to genetic factors, development [88], the feeding on environmental bacteria, or egg residuals [89–91]. Such a strong change in BC from sac fry stages until start-feeding has been described as well by Bakke et al. (2015) [92]. As in the SCF stage, the BC is dominated by the molecular strain zOTU 2 (*Perlucidibaca piscinae* with 99.5% similarity). However, further high abundant zOTUs belonged to the genera *Rubritalea*, *Pseudomonas*, or *Aeromonas*. zOTU 9 (*Rubritalea tangerine* with 97.0% similarity) has been isolated from marine animals [93], while zOTU 7 (*Aeromonas* species) displayed a 100% similarity with seven possible strains. It should be noted that some *Aeromonas* species are considered pathogenic [94,95]. zOTU 5 (*Pseudomonas gessardii* with 100% similarity) and zOTU 28 (*Pseudomonas proteolytica* with 100% similarity) are associated with mineral water [96] and cyanobacteria [97], respectively.

In the late developmental stages (i.e., 69 to 95 dpf), the effective richness increased first, then dropped after reaching the highest effective richness in FY3 stage. There are only small changes between single stages, although the shifts between FY1, FY3, and FY5 are larger. Most studies dealing with later developmental stages only analyzed the gut microbiome, as the gut microbiome is presumed to have a major influence on the immune defense and digestive system of the fish [98]. However, the microbiome on the surface of the fish and in the mucous has a protective effect against pathogens [99,100], thus the BC of the complete fish is relevant. Further, in some studies, samples were collected from the complete organism for the early developmental stages and only from the intestine for later developmental stages [27,101,102], hampering a relevant comparison of these stages due to biased sampling. Other studies only considered either the egg [62,103] or the later developmental stages after hatching [104]. In order to collect comparable data over a longer period of development, it is necessary to bring together all samples in succession using exactly the same methods of sampling, DNA extraction, library preparation, sequencing, and even data analysis [105]. Consequently, it is only possible to compare the results of different microbiome studies to a very limited extent, as the impact of the chosen approach is high. In the present study, for the first time various developmental stages of brown trout from the same fish hatchery have been sampled and processed in the same manner.

Between the stages SUF and FY1, start-feeding had been initiated. Hence, FY1-fish's BC had been influenced by feed-specific bacteria. Even if SUF had not been in contact with feed yet, the family Rubritaleaceae, which has been associated in other studies with



feeding [106], appeared and increased in number in FY1 stage. Interestingly, in later stages, this family seemed to have vanished (Figure 4), while in ballan wrasse, Rubritaleaceae have been mostly associated with early embryonic BC [62]. Remarkably, the genus *Perlucidibaca* decreased between SUF (19.8%) and FY1 (1.2%), but increased again later (FY2, 11.4%; FY3, 16.0%; FY4, 29.0%). In the last fry stage (i.e., FY5) it decreased slightly (15.9%). In difference to the other fry stages, SUF and FY1 were dominated mostly by the genera *Rubritalea* and *Pseudomonas*, while later stages beside FY5 displayed *Flavobacterium*, *Paraperlucidibaca*, *Perlucidibaca*, and *Photobacterium* for genera with more than 2.0% of relative abundance. While in other studies *Flavobacterium* [27,63,103] and *Photobacterium* [27,63,101] were often described in fish, the biological origin of the other genera is harder to place.

Surprisingly, after the FY3 stage, the bacterial diversity decreased (Figure 1) and in FY5, the bacterial community displayed strong changes compared to the other stages. In comparison to all other stages, this stage was dominated by the genus *Flavobacterium* (33.5%) followed by *Deefgea* (18.5%), a genus not displayed in higher abundances in any other stage. Both genera include species that are known or at least thought to be pathogenic to fish [107]. While *Flavobacterium branchiophilum*, *Flavobacterium columnare*, and *Flavobacterium psychrophilum* and other species are known fish pathogens [108], other *Flavobacterium* species are not. In this study, three different molecular strains, zOTU 4, zOTU 18 and zOTU 22, which all belonged to the genus *Flavobacterium*, displayed high abundances in the early developmental stages and were significantly different between the developmental stages. While zOTU 4 and zOTU 18 first appeared in SCF and SUF and showed high abundances especially later in FY3, zOTU 22 occurred almost exclusively in the EYG stage and was found in every sample of both lines. zOTU 4 occurred in all later developmental stages with the highest abundance in the fry stage FY5. It was not possible to determine in this study whether certain zOTUs were pathogenic, as 16S rRNA gene amplicon sequencing allows no direct identification of species but a comparison of strain similarity. Nevertheless, the large increase in *Flavobacterium* species at the end of the experiment indicates infection with a pathogenic species. Even though the *Flavobacterium* and probable *Deefgea* species found here did not display direct pathogenicity with clinical signs, such bacteria might cause a loss of fitness in fry, for instance causing subsequent mass infection with *Ichthyobodo necator* after 95 dpf. Dysbiosis of the microbiome increases the susceptibility of the fish to other pathogens. Furthermore, it has already been shown that infection with parasites, such as *Ichthyophthirius multifiliis*, may decrease bacterial diversity and an increase in Flavobacteriaceae in fish [109].

The data presented suggest that the manipulation of the fish's BC might be possible directly after oviposition and hatching. Because these two timeframes display great shifts in the BC, the introduction of beneficial strains might be best possible in those stages. However, currently, no suitable probiotic strain has been identified. In future studies, it is advisable to repeat the sampling of brown trout during ontogeny with higher sample numbers and if possible, even in different fish farms using the exact same approach (i.e., sampling *in toto*, using the same DNA extraction, library preparation, and sequencing) since otherwise comparison is restricted [105].

## 5. Conclusions

The present study describes the BC from egg pre-fertilization to fry 95 dpf. We found that brown trout's BC changed strongly during early development and then stabilized after the first feeding. The later developmental stages displayed considerably less significant differences between the stages BC. Since hardly any studies exist that sampled all mentioned stages with the same method and coherent data for the brown trout's ontogeny are missing, this study provides a new insight into the development of brown trout BC during ontogeny. Further, opportunities for an intervention (e.g., probiotic, prebiotic, or optimized rearing condition) in the BC and thus, the fitness of fish, might be possible directly after fertilizing the egg and shortly after hatching. It is likely, as other authors described as well, that an intervention in the BC of brown trout during development needs to be adjusted to

the rearing environment. In sum, even a more sophisticated and detailed analysis of the BC in embryogenic stages and further methods such as metagenomics will be needed to understand the colonization of brown trout embryos.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11010211/s1>, Table S1: OTU Table of all samples, Table S2: zOTU Table of all samples.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.K.S., S.U., H.W. and K.K.; methodology, K.K., S.U. and J.W.; software, K.K. and J.W.; validation, J.W., I.L. and K.N.; formal analysis, K.K. and J.W.; investigation, K.K., A.W., S.U., P.K. and J.W.; resources, R.K.S., S.U. and H.W.; data curation, K.K.; writing—original draft preparation, K.K.; writing—review and editing, J.W., S.U., K.N. and R.K.S.; visualization, K.K. and J.W.; supervision, J.W., S.U. and R.K.S.; project administration, R.K.S. and S.U.; funding acquisition, S.U. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Bavarian State Ministry of Food, Agriculture and Forestry, grant number A/19/16.

**Institutional Review Board Statement:** Ethical approval was waived for this study; the parameters and samples of the experiment were taken in the normal rearing process of the Institute of Fisheries. No interventions were carried out on the animals before killing. No animals were harmed or damaged in any way.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are openly available in the Sequence Read Archive under the reference number PRJNA909450.

**Acknowledgments:** We specially thank Eva Bengler, Stephanie Hiereth, and Christoph Kleinemeier for providing substantial assistance in the laboratory and stimulating discussions. We would also like to thank Walter Strohmeier and Andreas Streicher for their help handling the fish during the experiment.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. *World Population Prospects 2022: Summary of Results*; UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3; UN: New York, NY, USA, 2022.
2. FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in Action*; FAO: Rome, Italy, 2020.
3. FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*; FAO: Rome, Italy, 2022.
4. Costello, C.; Ovando, D.; Clavelle, T.; Strauss, C.K.; Hilborn, R.; Melnychuk, M.C.; Branch, T.A.; Gaines, S.D.; Szuwalski, C.S.; Cabral, R.B. Global fishery prospects under contrasting management regimes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 5125–5129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Cooke, S.J.; Twardek, W.M.; Lennox, R.J.; Zolderdo, A.J.; Bower, S.D.; Gutowsky, L.F.; Danylchuk, A.J.; Arlinghaus, R.; Beard, D. The nexus of fun and nutrition: Recreational fishing is also about food. *Fish Fish.* **2018**, *19*, 201–224. [[CrossRef](#)]
6. Mueller, M.; Pander, J.; Geist, J. Comprehensive analysis of > 30 years of data on stream fish population trends and conservation status in Bavaria, Germany. *Biol. Conserv.* **2018**, *226*, 311–320. [[CrossRef](#)]
7. BurrIDGE, L.; Weis, J.S.; Cabello, F.; Pizarro, J.; Bostick, K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* **2010**, *306*, 7–23. [[CrossRef](#)]
8. Bassitta, R.; Nottensteiner, A.; Bauer, J.; Straubinger, R.K.; Hölzel, C.S. Spread of antimicrobial resistance genes via pig manure from organic and conventional farms in the presence or absence of antibiotic use. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *133*, 2457–2465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. UN General Assembly. Transforming Our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development. Available online: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/water-and-sanitation/> (accessed on 10 October 2022).
10. Hoess, R.; Geist, J. Nutrient and fine sediment loading from fish pond drainage to pearl mussel streams—Management implications for highly valuable stream ecosystems. *J. Environ. Manag.* **2022**, *302*, 113987. [[CrossRef](#)]
11. Pirog, R.; Van Pelt, T.; Enshayan, K.; Cook, E. *Food, Fuel, and Freeways: An Iowa Perspective on How Far Food Travels, Fuel Usage, and Greenhouse Gas Emissions*; Leopold Center for Sustainable Agriculture: Ames, IA, USA, 2001; Volume 209.
12. Elliott, J.M. Wild brown trout *Salmo trutta*: An important national and international resource. *Freshw. Biol.* **1989**, *21*, 1–5. [[CrossRef](#)]
13. Crisp, D.T. The environmental requirements of salmon and trout in fresh water. *Freshw. Forum* **1993**, *3*, 176–202.
14. Eklöv, A.G.; Greenberg, L.; Brönmark, C.; Larsson, P.; Berglund, O. Influence of water quality, habitat and species richness on brown trout populations. *J. Fish Biol.* **1999**, *54*, 33–43. [[CrossRef](#)]



15. Jonsson, B.; Jonsson, N. A review of the likely effects of climate change on anadromous Atlantic salmon *Salmo salar* and brown trout *Salmo trutta*, with particular reference to water temperature and flow. *J. Fish Biol.* **2009**, *75*, 2381–2447. [CrossRef] [PubMed]
16. Gallet, A.; Halary, S.; Duval, C.; Huet, H.; Duperron, S.; Marie, B. Disruption of fish gut microbiota composition and holobiont metabolome by cyanobacterial blooms. *bioRxiv* **2021**. [CrossRef]
17. Foyal, M.J.; Fotedar, R.; Tay, C.-Y.; Gupta, S.K. Biological filters regulate water quality, modulate health status, immune indices and gut microbiota of freshwater crayfish, marron (*Cherax cainii*, Austin, 2002). *Chemosphere* **2020**, *247*, 125821. [CrossRef] [PubMed]
18. Wilkins, L.G.; Rogivue, A.; Schütz, F.; Fumagalli, L.; Wedekind, C. Increased diversity of egg-associated bacteria on brown trout (*Salmo trutta*) at elevated temperatures. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17084. [CrossRef] [PubMed]
19. Berg, G.; Rybakova, D.; Fischer, D.; Cernava, T.; Vergès, M.-C.C.; Charles, T.; Chen, X.; Cocolin, L.; Eversole, K.; Corral, G.H. Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome* **2020**, *8*, 1–22.
20. McFall-Ngai, M.; Hadfield, M.G.; Bosch, T.C.; Carey, H.V.; Domazet-Lošo, T.; Douglas, A.E.; Dubilier, N.; Eberl, G.; Fukami, T.; Gilbert, S.F. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 3229–3236. [CrossRef]
21. Foster, K.R.; Schluter, J.; Coyte, K.Z.; Rakoff-Nahoum, S. The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature* **2017**, *548*, 43–51. [CrossRef]
22. Albert, V.; Ransangan, J. Effect of water temperature on susceptibility of culture marine fish species to vibriosis. *Int. J. Res. Pure Appl. Microbiol.* **2013**, *3*, 48–52.
23. Vasemägi, A.; Visse, M.; Kisand, V. Effect of environmental factors and an emerging parasitic disease on gut microbiome of wild salmonid fish. *MSphere* **2017**, *2*, e00418-17. [CrossRef]
24. Ellis, A. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* **2001**, *25*, 827–839. [CrossRef]
25. Treasurer, J.W.; Cochrane, E.; Grant, A. Surface disinfection of cod *Gadus morhua* and haddock *Melanogrammus aeglefinus* eggs with bronopol. *Aquaculture* **2005**, *250*, 27–35. [CrossRef]
26. Wedekind, C.; Gessner, M.O.; Vazquez, F.; Maerki, M.; Steiner, D. Elevated resource availability sufficient to turn opportunistic into virulent fish pathogens. *Ecology* **2010**, *91*, 1251–1256. [CrossRef] [PubMed]
27. Lokesh, J.; Kiron, V.; Sipkema, D.; Fernandes, J.M.; Moum, T. Succession of embryonic and the intestinal bacterial communities of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals stage-specific microbial signatures. *Microbiologyopen* **2019**, *8*, e00672. [CrossRef] [PubMed]
28. Neuman, C.; Hatje, E.; Zarkasi, K.Z.; Smullen, R.; Bowman, J.P.; Katouli, M. The effect of diet and environmental temperature on the faecal microbiota of farmed Tasmanian Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Res.* **2016**, *47*, 660–672. [CrossRef]
29. Feng, J.B.; Hu, C.Q.; Luo, P.; Zhang, L.P.; Chen, C. Microbiota of yellow grouper (*Epinephelus awoora* Temminck & Schlegel, 1842) fed two different diets. *Aquac. Res.* **2010**, *41*, 1778–1790.
30. Minniti, G.; Hagen, L.H.; Porcellato, D.; Jørgensen, S.M.; Pope, P.B.; Vaaje-Kolstad, G. The skin-mucus microbial community of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2043. [CrossRef]
31. Webster, T.M.U.; Consuegra, S.; de Leaniz, C.G. Early life stress causes persistent impacts on the microbiome of Atlantic salmon. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genom. Proteom.* **2021**, *40*, 100888. [CrossRef]
32. Brämick, U. *Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2020*; Institut für Binnenfischerei e.V. Potsdam-Sacrow: Potsdam, Germany, 2020.
33. Collins, S.A.; Øverland, M.; Skrede, A.; Drew, M.D. Effect of plant protein sources on growth rate in salmonids: Meta-analysis of dietary inclusion of soybean, pea and canola/rapeseed meals and protein concentrates. *Aquaculture* **2013**, *400*, 85–100. [CrossRef]
34. Michl, S.C.; Ratten, J.-M.; Beyer, M.; Hasler, M.; LaRoche, J.; Schulz, C. The malleable gut microbiome of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Diet-dependent shifts of bacterial community structures. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177735. [CrossRef]
35. Michl, S.C.; Beyer, M.; Ratten, J.-M.; Hasler, M.; LaRoche, J.; Schulz, C. A diet-change modulates the previously established bacterial gut community in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2339. [CrossRef]
36. Rogall, E.T.; Jacob, S.; Triebskorn, R.; Schwartz, T.J.E.S.E. The impact of the anti-diabetic drug metformin on the intestinal microbiome of larval brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*). *Environ. Sci. Eur.* **2020**, *32*, 65. [CrossRef]
37. Tierschutzgesetz. Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 105 des Gesetzes vom 10. August 2021 (BGBl. I S. 3436) geändert worden ist. 24.07.1972. Available online: <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html> (accessed on 22 December 2022).
38. German Federal Ministry of Justice and Consumer Protection. *Verordnung zum Schutz von Tieren im Zusammenhang mit der Schlachtung oder Tötung und Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1099/2009 des Europäischen Rates (Tierschutz-Schlachtverordnung—TierSchlV)*; German Federal Ministry of Justice and Consumer Protection: Berlin, Germany, 2012.
39. European Commission. Commission Regulation of 24 September 2009 on the Protection of Animals at Slaughter, 1099/2009/EC. *Off. J. Eur. Union* **2009**. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?uri=celex%3A32009R1099> (accessed on 22 December 2022).
40. Godon, J.-J.; Zumstein, E.; Dabert, P.; Habouzit, F.; Moletta, R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 2802–2813. [CrossRef] [PubMed]
41. Reitmeier, S.; Kiessling, S.; Neuhaus, K.; Haller, D. Comparing circadian rhythmicity in the human gut microbiome. *STAR Protoc.* **2020**, *1*, 100148. [CrossRef] [PubMed]

42. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41, e1. [[CrossRef](#)]
43. Lagkouvardos, I.; Kläring, K.; Heinzmann, S.S.; Platz, S.; Scholz, B.; Engel, K.H.; Schmitt-Kopplin, P.; Haller, D.; Rohn, S.; Skurk, T. Gut metabolites and bacterial community networks during a pilot intervention study with flaxseeds in healthy adult men. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015, 59, 1614–1628. [[CrossRef](#)]
44. Lagkouvardos, I.; Joseph, D.; Kapfhammer, M.; Giritli, S.; Horn, M.; Haller, D.; Clavel, T.J.S.r. IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Sci. Rep.* 2016, 6, 33721. [[CrossRef](#)]
45. Edgar, R.C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 2013, 10, 996–998. [[CrossRef](#)]
46. Edgar, R.C.; Haas, B.J.; Clemente, J.C.; Quince, C.; Knight, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 2011, 27, 2194–2200. [[CrossRef](#)]
47. Edgar, R.C. UNOISE2: Improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *bioRxiv* 2016, 081257.
48. Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010, 26, 2460–2461. [[CrossRef](#)]
49. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2012, 41, D590–D596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016, 33, 1870–1874. [[CrossRef](#)]
51. Yoon, S.-H.; Ha, S.-M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017, 67, 1613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Parte, A.C.; Carbasse, J.S.; Meier-Kolthoff, J.P.; Reimer, L.C.; Göker, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020, 70, 5607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Oren, A.; Garrity, G.M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2021, 71, 005056. [[CrossRef](#)]
54. Lagkouvardos, I.; Fischer, S.; Kumar, N.; Clavel, T.J.P. Rhea: A transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ* 2017, 5, e2836. [[CrossRef](#)]
55. Jost, L. Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology* 2007, 88, 2427–2439. [[CrossRef](#)]
56. Chen, J.; Bittinger, K.; Charlson, E.S.; Hoffmann, C.; Lewis, J.; Wu, G.D.; Collman, R.G.; Bushman, F.D.; Li, H. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics* 2012, 28, 2106–2113. [[CrossRef](#)]
57. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 1995, 57, 289–300. [[CrossRef](#)]
58. Prodan, A.; Tremaroli, V.; Brolin, H.; Zwinderman, A.H.; Nieuwdorp, M.; Levin, E. Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLoS ONE* 2020, 15, e0227434. [[CrossRef](#)]
59. Llewellyn, M.S.; McGinnity, P.; Dionne, M.; Letourneau, J.; Thonier, F.; Carvalho, G.R.; Creer, S.; Derome, N. The biogeography of the atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiome. *ISME J.* 2016, 10, 1280–1284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Hansen, G.H.; Olafsen, J.A. Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish. *Microb. Ecol.* 1999, 38, 1–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Llewellyn, M.S.; Boutin, S.; Hoseinifar, S.H.; Derome, N. Teleost microbiomes: The state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Front. Microbiol.* 2014, 5, 207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Bone, A.; Bekaert, M.; Papadopoulou, A.; McMillan, S.; Adams, A.; Davie, A.; Desbois, A.P. Bacterial communities of ballan wrasse (*Labrus bergylta*) eggs at a commercial marine hatchery. *Curr. Microbiol.* 2021, 78, 114–124. [[CrossRef](#)]
63. Najafpour, B.; Pinto, P.I.S.; Moutou, K.A.; Canario, A.V.M.; Power, D.M. Factors Driving Bacterial Microbiota of Eggs from Commercial Hatcheries of European Seabass and Gilthead Seabream. *Microorganisms* 2021, 9, 2275. [[CrossRef](#)]
64. Wilkins, L.G.; Rogivue, A.; Fumagalli, L.; Wedekind, C. Declining diversity of egg-associated bacteria during development of naturally spawned whitefish embryos (*Coregonus spp.*). *Aquat. Sci.* 2015, 77, 481–497. [[CrossRef](#)]
65. Wedekind, C. Induced hatching to avoid infectious egg disease in whitefish. *Curr. Biol.* 2002, 12, 69–71. [[CrossRef](#)]
66. Brivio, M.F.; Bassi, R.; Cotelli, F. Identification and characterization of the major components of the *Oncorhynchus mykiss* egg chorion. *Mol. Reprod. Dev.* 1991, 28, 85–93. [[CrossRef](#)]
67. Abdul Razak, S.; Griffin, M.J.; Mischke, C.C.; Bosworth, B.G.; Waldbieser, G.C.; Wise, D.J.; Marsh, T.L.; Scribner, K.T. Biotic and abiotic factors influencing channel catfish egg and gut microbiome dynamics during early life stages. *Aquaculture* 2019, 498, 556–567. [[CrossRef](#)]
68. Califano, G.; Castanho, S.; Soares, F.; Ribeiro, L.; Cox, C.J.; Mata, L.; Costa, R. Molecular Taxonomic Profiling of Bacterial Communities in a Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Hatchery. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 204. [[CrossRef](#)]
69. Roalkvam, I.; Drønen, K.; Dahle, H.; Wergeland, H.I. Microbial Communities in a Flow-Through Fish Farm for Lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) During Healthy Rearing Conditions. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 1594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Pheng, S.; Lee, J.J.; Eom, M.K.; Lee, K.H.; Kim, S.G. *Paucibacter oligotrophus* sp. nov., isolated from fresh water, and emended description of the genus *Paucibacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017, 67, 2231–2235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Lалуat, J.; Pares, R.; Schlegel, H.G. *Pseudomonas taeniospiralis* sp. nov., an R-Body-Containing Hydrogen Bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1982, 32, 332–338. [[CrossRef](#)]



72. Zhou, D.; Tan, X.; Zhang, W.; Chen, H.Y.; Fan, Q.M.; He, X.L.; Lv, J. *Rhodiferax bucti* sp. nov., isolated from fresh water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019, 69, 3903–3909. [[CrossRef](#)]
73. Stoecker, K.; Bendinger, B.; Schöning, B.; Nielsen, P.H.; Nielsen, J.L.; Baranyi, C.; Toenshoff, E.R.; Daims, H.; Wagner, M. Cohn's Crenothrix is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 2363–2367. [[CrossRef](#)]
74. Hansen, G.H.; Olafsen, J.A. Bacterial Colonization of Cod (*Gadus morhua* L.) and Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) Eggs in Marine Aquaculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989, 55, 1435–1446. [[CrossRef](#)]
75. Fujimoto, M.; Crossman, J.A.; Scribner, K.T.; Marsh, T.L. Microbial community assembly and succession on lake sturgeon egg surfaces as a function of simulated spawning stream flow rate. *Microb. Ecol.* 2013, 66, 500–511. [[CrossRef](#)]
76. Galindo-Villegas, J.; García-Moreno, D.; de Oliveira, S.; Meseguer, J.; Mulero, V. Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during zebrafish development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, E2605–E2614. [[CrossRef](#)]
77. Zapata, A.; Diez, B.; Cejalvo, T.; Gutiérrez-de Frías, C.; Cortés, A. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2006, 20, 126–136. [[CrossRef](#)]
78. Bates, J.M.; Mittge, E.; Kuhlman, J.; Baden, K.N.; Cheesman, S.E.; Guillemin, K. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev. Biol.* 2006, 297, 374–386. [[CrossRef](#)]
79. Chung, H.; Pamp, S.J.; Hill, J.A.; Surana, N.K.; Edelman, S.M.; Troy, E.B.; Reading, N.C.; Villablanca, E.J.; Wang, S.; Mora, J.R.; et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* 2012, 149, 1578–1593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Igerslev, H.C.; von Gersdorff Jørgensen, L.; Lenz Strube, M.; Larsen, N.; Dalsgaard, I.; Boye, M.; Madsen, L. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture* 2014, 424–425, 24–34. [[CrossRef](#)]
81. Wells, P.; Pinder, A. The respiratory development of Atlantic salmon. I. Morphometry of gills, yolk sac and body surface. *J. Exp. Biol.* 1996, 199, 2725–2736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Stephens, W.Z.; Burns, A.R.; Stagaman, K.; Wong, S.; Rawls, J.F.; Guillemin, K.; Bohannon, B.J. The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. *ISME J.* 2016, 10, 644–654. [[CrossRef](#)]
83. Nikouli, E.; Meziti, A.; Antonopoulou, E.; Mente, E.; Kormas, K.A. Host-Associated Bacterial Succession during the Early Embryonic Stages and First Feeding in Farmed Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Genes* 2019, 10, 483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Tytler, P.; Blaxter, J.H.S. Drinking in yolk-sac stage larvae of the halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish Biol.* 1988, 32, 493–494. [[CrossRef](#)]
85. Song, J.; Choo, Y.J.; Cho, J.C. *Perlucidibaca piscinae* gen. nov., sp. nov., a freshwater bacterium belonging to the family Moraxellaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008, 58, 97–102. [[CrossRef](#)]
86. Spring, S.; Kämpfer, P.; Schleifer, K.H. *Limnobacter thiooxidans* gen. nov., sp. nov., a novel thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from freshwater lake sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001, 51, 1463–1470. [[CrossRef](#)]
87. Franzmann, P.D.; Skerman, V.B.D. *Agitococcus lubricus* gen. nov. sp. nov., a Lipolytic, Twitching Coccus from Freshwater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1981, 31, 177–183. [[CrossRef](#)]
88. Vadstein, O.; Attramadal, K.J.K.; Bakke, I.; Forberg, T.; Olsen, Y.; Verdegem, M.; Giatsis, C.; Skjermo, J.; Aasen, I.M.; Gatesoupe, F.J.; et al. Managing the Microbial Community of Marine Fish Larvae: A Holistic Perspective for Larviculture. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 1820. [[CrossRef](#)]
89. Olafsen, J. Ingestion of bacteria by cod (*Gadus morhua* L.) larvae. In Proceedings of the Propagation of Cod *Gadus morhua* L. An International Symposium, Arendal, Norway, 14–17 June 1983.
90. Olafsen, J.A.; Hansen, G.H. Intact antigen uptake in intestinal epithelial cells of marine fish larvae. *J. Fish Biol.* 1992, 40, 141–156. [[CrossRef](#)]
91. Beveridge, M.C.M.; Sikdar, P.K.; Frerichs, G.N.; Millar, S. The ingestion of bacteria in suspension by the common carp *Cyprinus carpio* L. *J. Fish. Biol.* 1991, 39, 825–831. [[CrossRef](#)]
92. Bakke, I.; Coward, E.; Andersen, T.; Vadstein, O. Selection in the host structures the microbiota associated with developing cod larvae (*Gadus morhua*). *Environ. Microbiol.* 2015, 17, 3914–3924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Yoon, J.; Matsuo, Y.; Matsuda, S.; Adachi, K.; Kasai, H.; Yokota, A. *Rubritalea spongiae* sp. nov. and *Rubritalea tangerina* sp. nov., two carotenoid- and squalene-producing marine bacteria of the family Verrucomicrobiaceae within the phylum 'Verrucomicrobia', isolated from marine animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007, 57, 2337–2343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Wiklund, T.; Dalsgaard, I. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: A review. *Dis. Aquat. Org.* 1998, 32, 49–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Menanteau-Ledouble, S.; Kumar, G.; Saleh, M.; El-Matbouli, M. *Aeromonas salmonicida*: Updates on an old acquaintance. *Dis. Aquat. Org.* 2016, 120, 49–68. [[CrossRef](#)]
96. Verhille, S.; Baida, N.; Dabboussi, F.; Hamze, M.; Izard, D.; Leclerc, H. *Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, 49 Pt 4, 1559–1572. [[CrossRef](#)]
97. Reddy, G.S.N.; Matsumoto, G.I.; Schumann, P.; Stackebrandt, E.; Shivaji, S. *Psychrophilic pseudomonads* from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004, 54, 713–719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

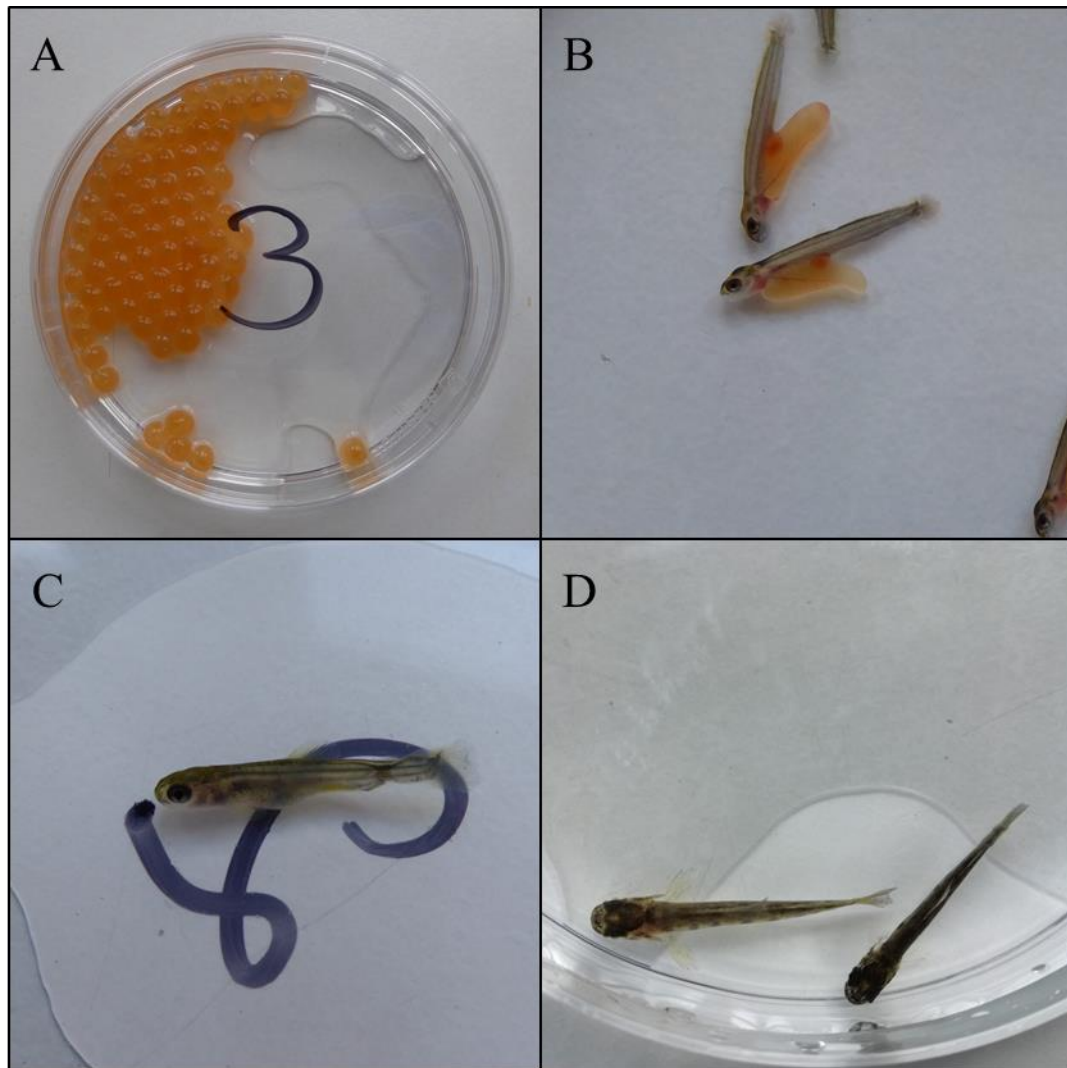
98. Tarnecki, A.M.; Burgos, F.A.; Ray, C.L.; Arias, C.R. Fish intestinal microbiome: Diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *123*, 2–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Lowrey, L.; Woodhams, D.C.; Tacchi, L.; Salinas, I. Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 6915–6925. [[CrossRef](#)]
100. Liu, Y.; De Bruijn, I.; Jack, A.L.; Drynan, K.; Van Den Berg, A.H.; Thoen, E.; Sandoval-Sierra, V.; Skaar, I.; Van West, P.; Diéguez-Uribeondo, J. Deciphering microbial landscapes of fish eggs to mitigate emerging diseases. *ISME J.* **2014**, *8*, 2002–2014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Romero, J.; Navarrete, P. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microb. Ecol.* **2006**, *51*, 422–430. [[CrossRef](#)]
102. Zhang, Z.; Yu, Y.; Jiang, Y.; Wang, Y.; Liao, M.; Rong, X.; Liu, Q. The intestine of artificially bred larval turbot (*Scophthalmus maximus*) contains a stable core group of microbiota. *Arch. Microbiol.* **2020**, *202*, 2619–2628. [[CrossRef](#)]
103. Wilkins, L.G.; Fumagalli, L.; Wedekind, C. Effects of host genetics and environment on egg-associated microbiotas in brown trout (*Salmo trutta*). *Microb. Ecol.* **2016**, *25*, 4930–4945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Giatsis, C.; Sipkema, D.; Smidt, H.; Heilig, H.; Benvenuti, G.; Verrth, J.; Verdegem, M. The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Abellan-Schneyder, I.; Machado, M.S.; Reitmeier, S.; Sommer, A.; Sewald, Z.; Baumbach, J.; List, M.; Neuhaus, K. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *Mosphere* **2021**, *6*, e01202-20. [[CrossRef](#)]
106. Wilkes Walburn, J.; Wemheuer, B.; Thomas, T.; Copeland, E.; O'Connor, W.; Booth, M.; Fielder, S.; Egan, S. Diet and diet-associated bacteria shape early microbiome development in Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*). *Microb. Biotechnol.* **2019**, *12*, 275–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Jung, A.; Jung-Schroers, V. Detection of *Deefgea chitinilytica* in freshwater ornamental fish. *Lett. Appl. Microbiol.* **2011**, *52*, 497–500. [[CrossRef](#)]
108. Loch, T.P.; Faisal, M. Emerging flavobacterial infections in fish: A review. *J. Adv. Res.* **2015**, *6*, 283–300. [[CrossRef](#)]
109. Zhang, X.; Ding, L.; Yu, Y.; Kong, W.; Yin, Y.; Huang, Z.; Zhang, X.; Xu, Z. The change of teleost skin commensal microbiota is associated with skin mucosal transcriptomic responses during parasitic infection by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2972. [[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.

## IV. DISKUSSION

Wenn die Haltungsbedingungen in der Aquakultur optimiert werden sollen, ist ein möglichst umfassendes und tiefes Verständnis des Mikrobioms bzw. der darin enthaltenen bakteriellen Gemeinschaft (BG) von Fischen von großer Bedeutung. Denn umfassende Kenntnisse der BG ermöglichen eine Dysbiose, also ein Ungleichgewicht innerhalb der BG, frühzeitig zu erkennen (INFANTE-VILLAMIL et al., 2021). Bereits vor dem Ausbruch einer Krankheit könnte eine Verschiebung der Zusammensetzung der BG detektiert werden. Dies bietet bereits vor dem Auftreten der ersten klinischen Anzeichen die Möglichkeit eines Eingriffs. Ein früher Eingriffszeitpunkt mit nicht-invasiven oder nebenwirkungsarmen medikamentöse Behandlungen kann zusätzlich den Einsatz von Antibiotika minimieren. Gleichzeitig ermöglicht ein frühes Eingreifen, Verluste im Fischbestand zu begrenzen. Die Vermeidung von Antibiotikaresistenzen, z.B. durch einen möglichst sparsamen Einsatz, sowie die Sicherung der Verfügbarkeit eines gesunden Lebensmittels wie Speisefisch entspricht dem Konzept und der Strategien der One-Health-Initiative (MCEWEN & COLLIGNON, 2018), die sich mit den Gefahren für die Gesundheit des Menschen beschäftigt. Bessere Kenntnisse über das funktionelle Mikrobiom von Fischen und besonders Bachforellen begünstigen zum anderen Eingriffe in die BG von Bachforellen durch Prä- und Probiotika. Dies könnte die Fitness der Fische verbessern und diese widerstandfähiger gegen Pathogene oder sich verschlechternde Umweltbedingungen machen (siehe Kapitel II.2.3.5).

In der vorliegenden Studie wurde die ontogenetische Entwicklung der BG der Bachforelle in verschiedenen Entwicklungsstadien vom unbefruchteten Ei, dem Ei im Augenpunktstadium, der Dottersackbrut nach dem Schlupf, der fressfähigen, aufschwimmenden Brut und der Brut bis 95 Tage nach der Befruchtung untersucht (siehe Abbildung 16). Dies ist die erste Studie, in der die Mikrobiota von Bachforellen während der Ontogenese beginnend beim unbefruchteten Ei mittels *16S-rRNA*-Genamplikon-Sequenzierung untersucht wurden.



**Abbildung 16: Beprobung der Bachforellen**

Die Bachforelle im Laufe ihrer Ontogenese mit den Stadien (A) unbefruchtetes Ei, (B) Dottersackbrut (C), fressfähige Brut und (D) Brut (95 dpf).

## 1.1 Durchführung

### 1.1.1 Haltung

Studien zum Mikrobiom und den Mikrobiota von Fischen werden oftmals als Aquarienversuche durchgeführt (MICHL et al., 2019; MENG et al., 2021). Doch auch der entgegengesetzte Ansatz, die Aufzucht in einer konventionellen Fischzucht, wird von verschiedenen Forschern verfolgt (NIKOULI et al., 2019; RAZAK et al., 2019). Um eine realistische Darstellung der BG unter kommerziellen Zuchtbedingungen zu erhalten, erfolgte in der vorliegenden Studie die Aufzucht der Bachforellen in offenen Rinnen und Becken in einer Fischzucht, deren Arbeitsabläufe denen einer kommerziellen Fischzucht glichen. In Hinblick auf die Umweltmikroorganismen



weichen die Bedingungen im Labor von denen der konventionellen Aquakultur ab. In konventionellen Fischzuchten sind grundlegende Hygienemaßnahmen verpflichtend, beispielsweise werden Gerätschaften, Schuhe und Hände nach vorgegebenen Schemata desinfiziert. Es handelt sich jedoch um offene Systeme (siehe Abbildung 17), in denen andere Bedingungen vorherrschen als in Laboren mit geschlossenen Aquarien, wo die Minimierung von externen mikrobiologischen Einflüssen das oberste Ziel ist. Dass unterschiedliche Aquakultursysteme Einfluss auf das Mikrobiom von Fischen haben, konnte in Studien bereits bestätigt werden (GIATSI et al., 2014; GIATSI et al., 2015).

Die Aufzucht und Beprobung in einer konventionell betriebenen Fischzucht, in der keine Laborbedingungen herrschen, schien keinen Einfluss auf die Datenqualität zu haben, insbesondere wurde bei der bioinformatischen Auswertung keine Kontamination der Proben festgestellt.



**Abbildung 17: Brutrinnen mit Siebeinsätzen**

Beim eingesetzten Futter handelte es sich um Standardforellenfutter (Biomar Forellenfutter INICIO Plus, Brande, Dänemark), welches vor der Fütterung nicht sterilisiert wurde.

Es ist möglich, dass in der Fischzucht selbst eine eigene spezifische BG existierte,

die Einfluss auf das Mikrobiom der Aquakulturfische hatte. Um dieser Frage genauer auf den Grund zu gehen, wurde in einer weiteren Studie ein Translokationsversuch mit Fischen aus zwei verschiedenen Fischzuchten durchgeführt (siehe Kapitel 1.4). Hierfür wurden Bachforellen von einer Fischzucht in die andere transportiert und mit nicht transportierten Gruppen verglichen. Die Hypothese, dass jede Fischzucht eine spezifische BG aufweist, die unabhängig von der Genetik der jeweiligen Fischpopulation Einfluss auf das Mikrobiom der Fische hat, muss jedoch in weiteren Studien untersucht werden.

### 1.1.2 Probenahmeverfahren und Herausforderungen

Der Großteil der Studien, die an Fischen durchgeführt werden, befasst sich mit adulten Tieren oder Tieren in Entwicklungsstadien, in denen der Verdauungstrakt bereits ausgebildet ist. Bei diesen Untersuchungen werden oftmals nur bestimmte Körperstellen beprobt wie z.B. der Darm, die Kiemen oder die Schleimhaut (BROWN et al., 2019; DULSKI et al., 2020a; LEGRAND et al., 2020; MINICH et al., 2020). Auch Autoren, die sich mit den Änderungen während der Ontogenese beschäftigen, untersuchen zum Teil nur den Darminhalt und führen ihre Studien mit Fischen durch, die bereits angefüttert wurden (STEPHENS et al., 2016; MICHL et al., 2019). Untersuchungen des Schleimhautmikrobioms werden ebenfalls hauptsächlich mit älteren Individuen durchgeführt. XAVIER et al. (2020) beispielweise untersuchten den Einfluss der Ontogenese auf die Schleimhaut von Riffbarschen (*Stegastes* spp.) und verglichen hierbei Jungfische und adulte Individuen. Andere Autoren beprobten die Eier *in toto* und verglichen sie mit dem Darminhalt von älteren Individuen (BURGOS et al., 2018; LOKESH et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Da in der vorliegenden Studie sehr junge Tiere untersucht wurden und bei den Eiern und den Entwicklungsstadien vor der Fütterung keine Ausdifferenzierung der normalerweise untersuchten Körperstellen, wie dem Gastrointestinaltrakt, vorhanden war, wurden die Fische aller Entwicklungsstadien *in toto* beprobt. So sollte eine Vergleichbarkeit der Proben über die verschiedenen Entwicklungsstadien gewährleistet werden. Die Beprobung des gesamten Fisches führte jedoch zu einer hohen Menge an Wirts-DNA, die während der DNA-Extraktion und in der Bibliotheksvorbereitung wahrscheinlich zu einer teilweisen Inhibierung des Endprodukts in mehreren Proben führte.

Probenmaterial, das mittels *16S-rRNA*-Genamplikon-Sequenzierung untersucht wird, weist üblicherweise eine deutlich geringere Menge an Wirts-DNA auf, da nur

bestimmte Gewebe, Abstriche oder Kot untersucht werden. Die Inhibierung der PCR stellt ein grundsätzliches Problem bei genetischen Untersuchungen dar. Verschiedene Inhibitoren im Blut können die PCR stören, was primär auf die Hemmung oder Inaktivierung der Taq-Polymerase zurückzuführen ist (KERMEKCHIEV et al., 2009). Auch im Kot finden sich Inhibitoren wie z.B. Gallensalze, die durch eine optimierte Probenvorbereitung zum Teil entfernt werden können (LANTZ et al., 1997). Eine Eliminierung der eukaryotischen DNA aus den Proben wird jedoch nicht durchgeführt (GODON et al., 1997; REITMEIER et al., 2020). Die Probleme bei der Sequenzierung führten dazu, dass zur Qualitätssicherung eine Reihe der Proben ausgeschlossen werden mussten.

## 1.2 Vergleichbarkeit der Studien

Bei der Betrachtung und Einordnung der Ergebnisse von verschiedenen Mikrobiomstudien muss die fehlende Vergleichbarkeit der Forschungsansätze berücksichtigt werden. Die immer neue Etablierung von Sequenzierungstechniken und -protokollen, sowie von Methoden der Datenauswertung sorgt für eine Flut von Variablen, die deutlichen Einfluss auf das Ergebnis einer *16S-rRNA*-Genamplikon-Sequenzierung haben können (BHARTI & GRIMM, 2021). Während laut eigener Angaben von Illumina weltweit mit Abstand die meisten Sequenzierungsdaten mit der Illumina-Sequenzierung durch Synthese (SBS) erzeugt werden und die somit eine weitestgehend einheitliche Basis liefert, weichen die Studien hinsichtlich vieler anderer Faktoren voneinander ab (ILLUMINA INC., 2017). Es gibt zahlreiche Parameter, die einen Einfluss auf die Ergebnisse haben können, beginnend bei der DNA-Isolierung (CLAASSEN et al., 2013; CHAPUIS et al., 2023) und der PCR. Während die Anzahl der PCR-Zyklen beeinflusst, ob bestimmte Bakterien deutlicher oder weniger deutlich in den Analysen repräsentiert werden (SALTER et al., 2014), hat auch besonders die Wahl der Primerpaare einen Einfluss auf die Ergebnisse (KLINDWORTH et al., 2013). Das Gen der 16S-rRNA verfügt über 9 hochvariable Regionen, von denen die V1-V3 Region (ALLEN et al., 2016), die V3-V4 Region (HPM, 2012) und die V3-V5 Region (ABELLAN-SCHNEYDER et al., 2021) mit den dazugehörigen Primern am häufigsten Ziel der Untersuchungen sind. Abhängig von der Wahl der Primerpaare werden bestimmte mikrobielle Gruppen nicht erfasst oder können anhand der entstehenden *reads* mittels der vorhandenen Datenbanken nur in höheren taxonomischen Ebenen ermittelt werden (ABELLAN-SCHNEYDER et al., 2021). Die Wahl der

bioinformatischen Pipeline sowie der taxonomischen Datenbank hat ebenso einen großen Einfluss auf das Ergebnis (PRODAN et al., 2020; SIERRA et al., 2020), wie die verschiedenen Ansätze von OTU oder zOTU. Während für OTUs Sequenzen mit einer Ähnlichkeit von 97% geclustert werden, ist ein zOTU (oder auch ESV: exact sequence variant bzw. ASV: amplicon sequence variant) eine einzelne Sequenz ohne Variablen (PORTER & HAJIBABAEI, 2018). Folglich ist die *richness* deutlich höher, wenn sie mit zOTUs berechnet wird, als bei einer Berechnung mit OTUs.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse betreffen auch das deutlich besser erforschte menschliche Mikrobiom. So gehen die Angaben darüber, wie viele Bakterienarten im menschlichen Darm gefunden werden können, weit auseinander – von 100-200 bis zu mehreren Tausend Arten (AVERSHINA & RUDI, 2015). Selbst auf Phylum-Ebene gibt es signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Studien. Während beispielsweise MICHL et al. (2019) für junge Bachforellen Pseudomonadota (ehemals Proteobacteria), Bacillota und Bacteroidota (ehemals Bacteroidetes) in absteigender Abundanz als die drei häufigsten Phyla fanden, waren die häufigsten Phyla in einer Studie mit jungen Bachforellen von ROGALL et al. (2020) Pseudomonadota, Actinomycetota (ehemals Actinobacteria) und Bacillota. In der vorliegenden Studie war ebenfalls Pseudomonadota das häufigste Phylum und hatte in jedem der Entwicklungsstadien eine Abundanz von über 50%. Bacteroidota und Bacillota gehörten ebenfalls zu den drei häufigsten Phyla der Studie. Es bleibt jedoch unklar, warum bereits auf Phylumebene so deutliche Abweichungen zwischen den Studien bestehen. Da es sich bei der BG um ein dynamisches System handelt (INFANTE-VILLAMIL et al., 2021), ist es denkbar, dass die Fische in den unterschiedlichen Studien tatsächlich sehr stark abweichende BG aufwiesen. Dies lässt sich bei stark abweichender Methodik und Auswertung jedoch nicht sicher sagen. Auf Grund der Vielzahl an Parametern, die Einfluss auf die Daten haben, wäre eine tatsächliche Vergleichbarkeit der Daten nur bei einer strikten Standardisierung der Methodik gegeben.

### 1.3 Kernmikrobiom

Bei der Betrachtung des Kernmikrobioms muss berücksichtigt werden, dass wie unter Kapitel II.2.1.2 beschrieben, keine einheitliche Definition existiert. Folglich sind auch die Ergebnisse der wissenschaftlichen Studien divergierend.

In der vorliegenden Studie zur Ontogenese der Bachforellen wurde über die verschiedenen Entwicklungsstadien hinweg kein eindeutiges Kernmikrobiom festgestellt. Nur zwei Familien (Comamonadaceae und Moraxellaceae) traten in allen Entwicklungsstadien auf. Hinsichtlich der zOTUS gab es keine Überschneidungen. Während zumindest fünf Familien in allen frühen Entwicklungsstadien erfasst wurden, gab es bei den zOTU große Verschiebungen, so dass kein zOTU in allen frühen Entwicklungsstadien gefunden werden konnte. Die späten Entwicklungsstadien zeigten mehr Stabilität innerhalb der BG und neben fünf Familien konnten auch fünf zOTUs in allen späteren Entwicklungsstadien nachgewiesen werden.

ZHANG et al. (2020) und NIKOULI et al. (2019) fanden beim Steinbutt (*Scophthalmus maximus*) und Goldbrasse (*Sparus aurata*) ein Kernmikrobiom auf OTU-Ebene. Erstere konnten das Kernmikrobiom sogar in zwei verschiedenen Fischzuchten nachweisen. Das Bakterium *Lactococcus piscium* war dabei besonders auffällig, da es in allen Entwicklungsstadien und in beiden Fischzuchten auftrat und immer einen Anteil über 10 % der fünf häufigsten Arten ausmachte.

Ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Studie beschreiben hingegen BURGOS et al. (2018) für den Getüpfelten Gabelwels (*Ictalurus punctatus*) mit signifikanten Veränderungen während der frühen Entwicklungsstadien und einer Stabilisierung bei späteren Entwicklungsstadien. Die Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass, falls bei Bachforellen ein Kernmikrobiom existiert, es sich jedoch erst am Ende oder nach Abschluss der Ontogenese ausbildet.

Die Studien an Steinbutt (*Scophthalmus maximus*) und Goldbrassen (*Sparus aurata*) erfolgten wie die vorliegende Studie an *in toto* beprobten Tieren, da in den frühen Entwicklungsstadien keine Differenzierung möglich ist. Unterschiedliche Körperstellen wie z.B. Darm und Schleimhaut zeigen jedoch große Unterschiede in ihrer BG (LOWREY et al., 2015; WEBSTER et al., 2018; MENG et al., 2021). Die *in toto* Beprobung gewährleistet einerseits die Vergleichbarkeit der verschiedenen Entwicklungsstadien, hat jedoch den Nachteil, dass Mikroorganismen die nur in bestimmten Körperbereichen auftauchen in der Auswertung unberücksichtigt bleiben, da sie in Bezug auf den ganzen Fischen nur in einer geringen Abundanz auftreten.

Wie bereits unter II.2.1.2 beschrieben, sind die Studien hinsichtlich des methodi-

schen Ansatzes ebenso unterschiedlich wie die genutzten Definitionen des Kernmikrobioms. Für eine abschließende Bewertung der Frage, in welcher Form ein Fischmikrobiom existiert, würde es daher zunächst einer Standardisierung der Definition des Kernmikrobioms sowie der methodischen Parameter bedürfen.

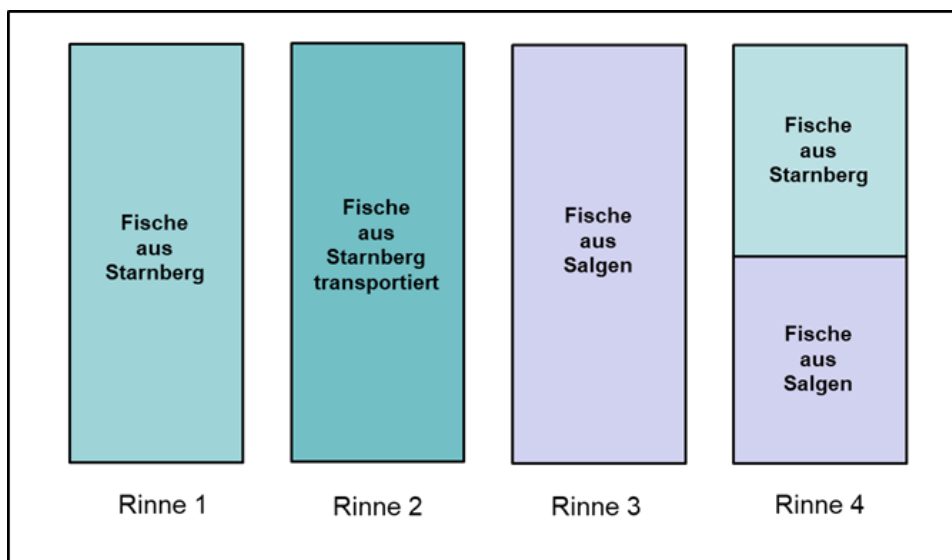
#### 1.4 Besatzversuch

Fische sind wie alle aquatischen Organismen immer von Wasser und den darin lebenden Mikroorganismen umgeben (ELLIS, 2001). Folglich ist der Einfluss des Mikrobioms der Umgebung in aquatischen Lebensräumen wahrscheinlich größer als in terrestrischen Habitaten. BURGOS et al. (2018) stellten fest, dass andere Faktoren wie die Nahrung einen größeren Einfluss haben können als die im umgebenden Wasser vorkommende Bakterien und dass die Mikroorganismen, die den Wirt besiedeln, nicht mit den Mikroorganismen im umgebenden Wasser übereinstimmen. Einige Studien zeigen große Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota zwischen Wildfischen und Fischen aus Aquakultur (RAMÍREZ & ROMERO, 2017b, 2017a) und eine deutliche Adaption des Mikrobioms bei einem Habitatwechsel (TARNECKI et al., 2019; WEBSTER et al., 2020). Es ist jedoch unklar, welchen Einfluss das Umgebungsmikrobiom des alten und neuen Lebensraums hat oder z.B. die Umstellung von industriell hergestellter Nahrung auf Naturnahrung und andersherum den entscheidenden Einfluss hat. Laut LAVOIE et al. (2018) wäre die Berücksichtigung der BG von großer Bedeutung bei dem Stützen des natürlichen Bestandes von Atlantischen Lachsen. Für das Management von anderen durch Besatz gestützten Arten kann dies ebenso angenommen werden.

Die nachstehend vorgestellte Studie sollte erste Hinweise dazu liefern, ob ein fischzuchtspezifisches Mikrobiom existiert und wie standortverlagerte Bachforellen auf die Konfrontation mit einem neuen Mikrobiom reagieren. Dies kann wichtige Erkenntnisse für den Transport von Fischen von einer zur anderen Fischzucht oder im Rahmen von Besatzmaßnahmen in offenen Gewässern bieten. Wie bei der vorhergegangenen Studie und den meisten Mikrobiomstudien lag der Schwerpunkt auf der BG der Fische. Mit Hilfe der MiSeq-Sequenzierung des *16 S rRNA*-Gens wurden die Verschiebungen innerhalb der Mikrobiota während der Umsiedlung von Bachforellen zwischen zwei verschiedenen Fischzuchten untersucht.

Der Probenahme für die Studie erfolgte 2021 mit Bachforellen vom Institut für Fi-

scherei in Starnberg – in dem auch die vorliegende Studie zur Ontogenese durchgeführt wurde – und dem Fischereihof des Bezirks Schwaben in Salgen. Die Bachforellen wurden von einer Fischzucht in die andere und umgekehrt transportiert. Ziel war es herauszufinden, welchen Einfluss das Mikrobiom des jeweiligen Betriebs auf die Bachforellen hat und wie die BG der Bachforelle auf das Umsetzen reagiert. Nach dem Transport befanden sich in einer der Rinnen als Kontrolle weiterhin Fische aus der jeweiligen Fischzucht, die nicht transportiert wurden. In der zweiten Rinne befanden sich Fische aus der Ursprungsfischzucht, für die der Transport zu der anderen Fischzucht mit einer eineinhalbstündigen Fahrt simuliert wurde. In der dritten Rinne waren Fische aus der jeweils anderen Fischzucht, wohingegen sich in der vierten Rinne Fische aus beiden Fischzuchten befanden, die durch ein Gitter getrennt waren (siehe Abbildung 18 für die Aufteilung in Starnberg).



**Abbildung 18: Verteilung der Fische in den Rinnen in Starnberg**

In Rinne 1 verblieben Fische aus Starnberg, ohne transportiert zu werden. In Rinne 2 hielten sich Fische auf, die aus Starnberg sind und dem Transportstress ausgesetzt wurden. In Rinne 3 wurden Fische aus Salgen nach Starnberg transportiert. Rinne 4 bildet eine gemischte Rinne mit Fischen aus Starnberg und aus Salgen. In Salgen erfolgte die Aufteilung kongruent.

Durch den gewählten Versuchsaufbau wurde die Grundlage zur Untersuchung verschiedener Kombinationen der Fische nach Standort und Herkunft geschaffen. Ziel war eine Differenzierung der Einflüsse auf die BG der Fische durch die Faktoren Transport, abiotische und biotische Umweltfaktoren an den zwei Standorten und

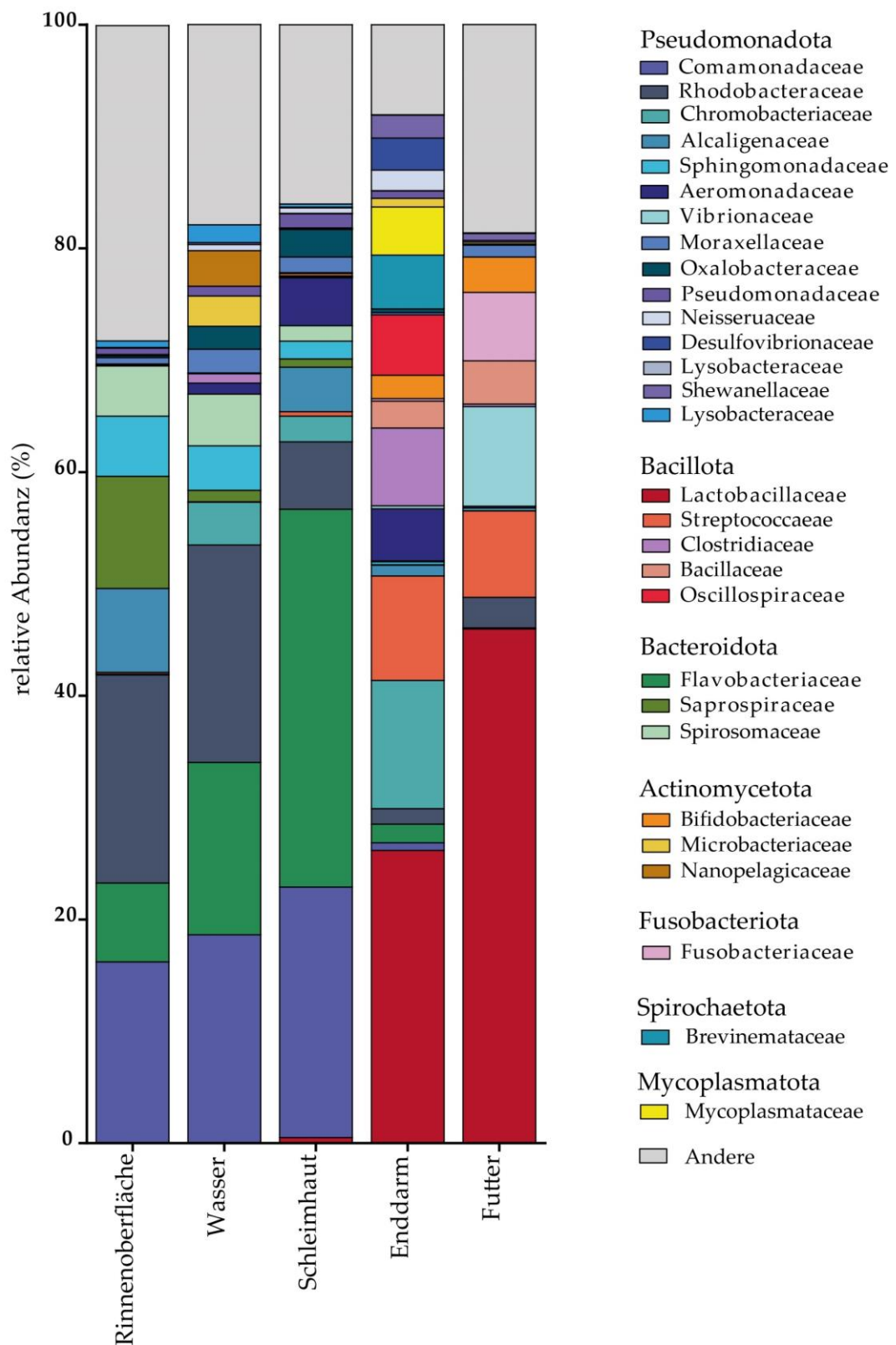
durch das Mikrobiom der jeweils anderen Population. Um den Faktor Futter auszuschließen, wurde das Futter der Fische an beiden Standorten vereinheitlicht. Die Probennahmen vor dem Transport dienten zur Definition des IST-Zustands in den beiden Fischzuchten. Ebenfalls beprobt wurden der Biofilm auf der Rinnenoberfläche und das Wasser in den Becken. Für die Wasserproben wurden pro Rinne drei Liter gefiltert.

Die Mikrobiota verschiedener Körperbereiche, wie auf oder in der Schleimhaut, im Blut oder im Gastrointestinaltrakt von Fischen erfüllen unterschiedliche Funktionen und sind unterschiedlichen Umgebungsbedingungen ausgesetzt, folglich unterscheiden sie sich in ihrer Zusammensetzung deutlich (MERRIFIELD & RODILES, 2015; FERCHIOU et al., 2023)). Dies konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden (siehe Abbildung 19).

Die ersten Auswertungen zeigen, dass es große Unterschiede zwischen Enddarm und Schleimhaut gibt, sowie zwischen den drei Umweltproben Wasser, Tupferprobe Rinnenoberfläche und Futter. Die Wasser- und Rinnenproben zeigten hinsichtlich ihrer BG Übereinstimmungen (siehe Abbildung 19) und clusterten entsprechend nah beieinander (siehe Abbildung 20). Während 66 zOTUs sowohl im Wasser als auch im Biofilm gefunden wurden, liegt die Übereinstimmung zwischen Schleimhaut und Wasser bei 38 zOTUs und zwischen Schleimhaut und Biofilm bei 23 zOTUs. Die Überschneidungen zwischen dem Enddarm und den Umweltproben war deutlich geringer, dafür konnten 38 zOTU sowohl im Enddarm als auch in der Futterprobe gefunden werden. Die beprobten Körperstellen Enddarm und Haut zeigten ebenfalls eine Überlappung von insgesamt 18 zOTUs (nicht dargestellt). Die Unterschiede zwischen den Probenarten (Enddarm, Schleimhaut, Wasser etc.) waren größer als zwischen den Fischzuchten. Besonders die Enddarmproben und die Umweltproben zeigten deutliche Unterschiede (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20). Dennoch waren die Proben aus den zwei Fischzuchten signifikant unterschiedlich zueinander.



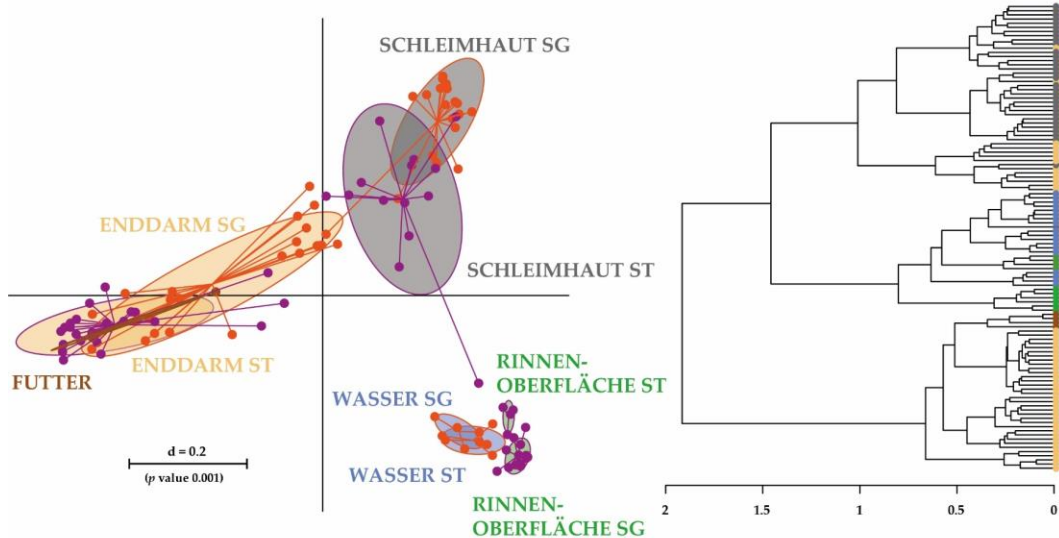
## Familien



**Abbildung 19: Bakterienfamilien der Fisch- und Umweltproben**

Dargestellt sind nur Familien mit einer relativen Häufigkeit von 2,0 % oder mehr in mindestens einer der untersuchten Probengruppe.

## (A) Multidimensionale Skalierung (MDS)-Plot (B) Dendrogramm

**Abbildung 20:  $\beta$ -Diversität der Fisch- bzw. Umweltproben in den beiden Fisch-zuchten**

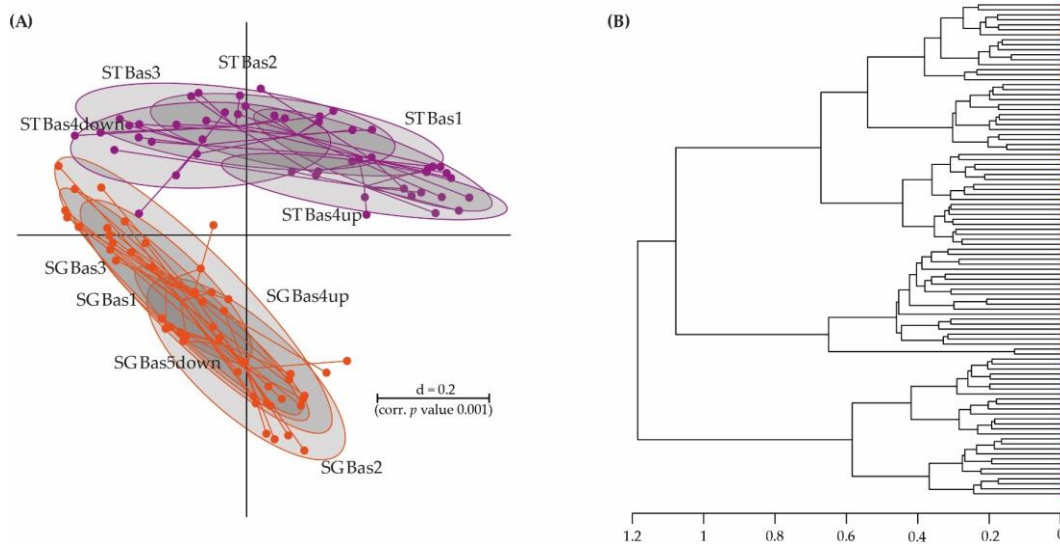
(A) MDS (Multidimensionale Skalierung) Plot; die Skala ist ein Indikator für die Variation in der taxonomischen Zusammensetzung der Mikrobiota zwischen den Proben ( $\beta$ -Diversität) auf der Grundlage verallgemeinerter UniFrac-Distanzen ( $d = 0,1$  markiert einen Unterschied von 10 %).

(B) Dendrogramm der Fisch- bzw. Umweltproben; die linken Farbpunkte stellen die Art der Probe dar; die rechten Farbpunkte zeigen den Ursprung der Proben;

Enddarm: orange; Schleimhaut: grau; Futter: braun; Wasser: blau; Rinnenoberfläche: grün; Salgen (SG): orange; Starnberg (ST): violett

In der vorliegenden Studie konnten einerseits Fischzucht-spezifische OTUs identifiziert werden, die entweder nur in einer Fischzucht vorkamen oder nur auf Fischen, die aus einer bestimmten Fischzucht stammten. Andererseits gab es eine Reihe von zOTUs, die in beiden Fischzuchten und in ähnlichen Abundanzen auftraten. Die Unterschiede zwischen den Fischzuchten waren besonders deutlich beim Schleimhautmikrobiom zu erkennen (siehe Abbildung 21). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von TARNECKI et al. (2019), die bei Gewöhnlichen Snooks (*Centropomus undecimalis*) feststellten, dass sich die Mikrobiota der Schleimhaut der Fische aus einer Kreislaufanlage, die in einen Freilandkäfig gesetzt wurden, innerhalb von 48 Stunden an die Mikrobiota der Wildfische anglichen. ZHANG et al. (2020) untersuchten Steinbutt-Individuen (*Scophthalmus maximus*) aus zwei verschiedenen Fischzuchten hinsichtlich ihres Darmmikrobioms und konnte deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der BG feststellen. Allerdings wichen die Haltungsbedingungen in den beiden Fischzuchten leicht voneinander ab. Die eine

Fischzucht nutze eine Kreislaufanlage, in der der größte Teil des Wassers rezirkuliert, und auch das Futter wurde leicht modifiziert. Dies erschwert die Interpretation der Ergebnisse, auch da viele Studien beispielweise beim Wechsel vom Freiland ins Labor oder andersherum das Futter als ausschlaggebend bezeichnen und der Einfluss des Umweltmikrobioms daher unklar bleibt (BOHLIN et al., 2002; LAVOIE et al., 2018).



### Abbildung 21: $\beta$ -Diversität der Schleimhautproben in den beiden Fischzuchten

(A) MDS (Multidimensionale Skalierung) Plot. Die Skala ist ein Indikator für die Variation in der taxonomischen Zusammensetzung der Mikrobiota zwischen den Proben ( $\beta$ -Diversität) auf der Grundlage verallgemeinerter UniFrac-Distanzen ( $d = 0,1$  markiert einen Unterschied von 10 %).

(B) Dendrogram; die Farbpunkte stellen den Ursprung der Proben dar.

Salgen (SG): orange; Starnberg (ST): violett; Bas1-4: Rinne 1-4; up: der obere Teil der Rinne mit Fischen aus beiden Fischzuchten; down: der untere Teil der Rinne mit Fischen aus beiden Fischzuchten

Da sich nur wenige Autoren mit dem Einfluss der Mikrobiota des Habitats auf das Fischmikrobiom beschäftigt haben, bedarf es dringend weiterer Forschung. Bisher gibt es wenige Studien dazu, woher die Bakterien in und auf dem Fisch stammen (INFANTE-VILLAMIL et al., 2021). Während WILKINS et al. (2016) den Einfluss der Muttertiere als vernachlässigbar und andere Faktoren wie die Nährstoffverfügbarkeit als entscheidender für die BG von Bachforelleneier beschreiben, bleibt dennoch unklar, woher die Bakterien, die Fische bereits während der Ontogenese besiedeln, primär stammen. Sowohl der Wirt als auch die Umgebung spielen

eine Rolle für die Zusammensetzung der BG und die Besiedlung während der Ontogenese, der genaue Einfluss und die Zusammensetzung der BG kann jedoch bis dato kaum prognostiziert werden (GIATSI et al., 2014; BLEDSOE et al., 2016).

Um den Antworten auf diese offenen Fragen näher zu kommen, widmete sich die erste der vorliegenden Studien der BG der Bachforelle während der Ontogenese. Die zweite Studie galt explizit der Frage, welchen Einfluss das Mikrobiom des umgebenden Habitats, in diesem Fall die zwei Fischzuchten auf die BG der Bachforelle hat. Dieses Wissen kann ebenso wie die Ergebnisse der ersten Studie bei der Beurteilung, welche Schwankungen in der BG normal sind und welche eine Dysbiose darstellen, helfen. Gleichzeitig sind die Ergebnisse relevant, um künftig Translokationen von Fischen, sei es im Rahmen von Managementmaßnahmen wie Besatz oder dem Transport von einer Fischzucht zur anderen, möglichst schonend zu gestalten und auch hier den Einfluss des Mikrobioms berücksichtigen zu können. Bereits heute sind Prä- und Probiotika auch bei Fischen untersucht und diskutierte Möglichkeiten, deren Einsatz aber am besten geplant und genutzt werden kann bei einem umfassenden Verständnis der BG und ihrer Einflussfaktoren.

In künftigen Studien sollten diese Untersuchungen vertieft werden. Von Interesse wären neben der Größe des Einflussfaktors Fischzucht bzw. Habitat auch eine Variation verschiedener Bachforellen-Populationen bzw. Forellenarten. Hierbei kann weiter der Frage auf den Grund gegangen werden, welche Parameter, also die genetischen Unterschiede der Fische oder die externen Mikrobiota den größeren Einfluss haben.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bachforelle (*Salmo trutta*) ist ein wichtiger Speisefisch in Europa, deren Produktion trotz langer Tradition zunehmend mit Herausforderungen konfrontiert ist. Durch den Klimawandel steigen nicht nur die Temperaturen, durch veränderte Niederschlagsmuster nehmen zudem Zeiten mit geringem Abfluss zu und schränken die Verfügbarkeit von kaltem, sauerstoffreichem Wasser ein, das für die Salmonidenproduktion benötigt wird. Die lokale Produktion von heimischen Fischarten in Teichwirtschaften mit Filtersystemen und Absetzbecken ist umweltverträglicher als der Import von Fischen aus Netzgehegen aus anderen Ländern und daher im Sinne der Nachhaltigkeit zukunftsfähiger. Eine große Rolle für den Gesundheitszustand von Tieren spielt die bakterielle Gemeinschaft (BG). Die BG sind alle bakteriellen Mitglieder des Mikrobioms, das definiert ist als die Gesamtheit der Mikroorganismen wie Bakterien, Archaeen, niedere und höhere Eukaryoten und Viren, ihre Genome und die sie umgebenden Umweltbedingungen in einem bestimmten Lebensraum.

Da die BG von entscheidender Bedeutung für die Immunabwehr und für die Gesundheit des Wirtsorganismus ist, erhöht eine umweltbedingte Dysbiose der BG die Anfälligkeit der Fische für Infektionen. Die Manipulation der BG und damit des Mikrobioms der Bachforelle könnte eine Möglichkeit zur Optimierung des Produktionsprozesses darstellen. Gleichzeitig könnte das frühzeitige Erkennen einer Dysbiose die Diagnose von Krankheiten in einem frühen Stadium ermöglichen.

Ziel dieser Arbeit war die Beschreibung der typischen BG der Bachforelle während der Embryonal- und Frühentwicklung. Umfassende Kenntnisse und das Verständnis der Zusammensetzung der BG sind die Voraussetzung für das frühzeitige Erkennen einer Dysbiose, sowie der Beeinflussung der BG durch die Haltungsbedingungen, oder Prä- oder Probiotika.

Das Mikrobiom von Fischen ist ein dynamisches System und abhängig von einer Vielzahl von Faktoren, wie z.B. Futter, physikalischen Faktoren, Haltungsbedingungen oder Habitatbeschaffenheit, Erkrankungen und Medikamente, sowie der BG des Habitats z.B. der Fischzucht oder des natürlichen Gewässers. Kenntnisse über die BG der Bachforelle, insbesondere während der Ontogenese, in der der

Embryo einem starken Erregerdruck ausgesetzt ist und die erste bakterielle Besiedlung nach dem Schlüpfen stattfindet, sind daher dringend erforderlich, bevor ein Eingriff möglich ist. In diesem Projekt wurde mittels *16S-rRNA*-Genamplifikonsequenzierung die Mikrobiota des gesamten Fisches vom unbefruchteten Ei bis zur Brut charakterisiert und hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer BG verglichen. In einer weiteren Studie wurde der Einfluss des Mikrobioms der Fischzucht auf die BG der Bachforelle untersucht. Alle untersuchten Stadien während der Ontogenese wurden *in toto* beprobt, um Verzerrungen aufgrund unterschiedlicher Probenahmeverfahren für die verschiedenen Entwicklungsstadien zu vermeiden.

Die verschiedenen Entwicklungsstadien zeigten deutliche Unterschiede bereits auf Phylumbene. Diese Veränderungen auf Ebene des Phylums bestanden häufig aus der Zu- oder Abnahme von einzelnen oder wenigen Familien. Mit einer Abundanz von über 50% war Pseudomonadota das häufigste Phylum in der BG zu allen Probenahmezeitpunkten. Zwei Familien (Comamonadaceae und Moraxellaceae) kamen in allen Entwicklungsstadien vor. Rhodobacteraceae, Comamonadaceae, Moraxellaceae, Lysobacteraceae und Burkholderiaceae kamen in allen frühen Entwicklungsstadien vom Ei bis zur fressfähigen Brut vor. In den späteren Entwicklungsstadien von der fressfähigen Brut und der Brut zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten konnten die fünf Familien Comamonadaceae, Moraxellaceae, Flavobacteriaceae, Alteromonadaceae, and Chitinophagaceae zu jedem Probenahmezeitpunkt nachgewiesen werden. Hinsichtlich der zOTUs gab es keine Überschneidungen über den gesamten Versuchsverlauf, sowie zwischen den frühen Entwicklungsstadien. Die späteren Entwicklungsstadien zeigten weniger Verschiebungen und fünf zOTUs konnten in allen Brutstadien und der fressfähigen Brut nachgewiesen werden. In den frühen Entwicklungsstadien bis 67 Tage nach der Befruchtung kam es zu großen Verschiebungen in der BG hinsichtlich der bakteriellen *richness* und der mikrobiellen Diversität. In den späteren Entwicklungsstadien schien sich die BG hingegen zu stabilisieren und wies geringere Veränderungen auf. Eine Manipulation der BG, um die Sterblichkeit der Embryonen zu verringern, sollte idealerweise direkt nach der Eiablage und nach dem Schlüpfen der Larvenstadien stattfinden. Da Fische bereits auf Populationsebene erheblich voneinander abweichende BG aufweisen, wird der Nachweis von nützlichen Mikroorganismen oder Kommensalen schwierig sein. Hierfür bedarf es weiterer ausführlicher Untersuchungen.

## VI. SUMMARY

The brown trout (*Salmo trutta*) is an important food fish in Europe, whose production is, despite a long tradition, more and more confronted with constraints. Rising temperatures and periods of low water discharge limit the availability of cold, oxygen-rich water required for salmonid production. Local production of native fish species in pond farms with filter systems and settling ponds is more environmentally friendly than importing fish from net pens from abroad (and therefore more ecological in terms of sustainability).

The bacterial community (BC) is essential for immune defense and the hosts' health. The BC or microbiota are all bacterial members of the microbiome, which itself is defined as the entirety of all microorganisms such as bacteria, archaea, lower and higher eukaryotes, and viruses, their genomes, and the environmental conditions surrounding them in a defined habitat.

Since the BC is of fundamental importance for the immune defense and the fitness of the host organism, an environmentally induced dysbiosis of the BC increases the susceptibility of the fish leading to infections. Manipulating the BC and thus the microbiome of the brown trout, could be a method to optimize the production process in aquaculture. At the same time the early detection of dysbiosis might allow the diagnosis of diseases at an early stage.

The aim of this work was to describe the typical BC of brown trout during embryonic and early development. This provides the base for further research on negative impacts on the microbiome of brown trout. The microbiome of an organism is determined on a variety of factors, such as feed, physical environmental factors, husbandry conditions, diseases, or medications. Therefore, wide knowledge about the BC of the brown trout is needed before any intervention is possible. Especially during ontogeny, as soon as after hatching the embryo is exposed to pathogens for the first time and the first bacterial colonization takes place. In this study, 16S rRNA gene amplicon sequencing was used to characterize the microbiota of whole fish from unfertilized egg to fry and to compare these developmental stages regarding their BC composition. All developmental stages were sampled *in toto* to avoid biases due to different sampling methods.



---

Pseudomonadota was the most abundant phylum in the BC of all developmental stages was. Only two families (Comamonadaceae and Moraxellaceae) occurred in all stages. Regarding the zOTU, there were no overlaps of all developmental stages. In the early developmental stages until 67 dpf, the BC displayed greater shifts in bacterial richness, microbial diversity, and taxonomic composition, while in the later developmental stages the BC seemed to stabilize and changed less. In sum, the manipulation of the BC to reduce embryo mortality might be possible directly after fertilizing the egg and shortly after hatching. Since fish already have significantly divergent BC at the population level, the detection of beneficial microorganisms will be difficult and require further detailed and even more sophisticated studies.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Aarts BG, Van Den Brink FW, Nienhuis PH. Habitat loss as the main cause of the slow recovery of fish faunas of regulated large rivers in Europe: the transversal floodplain gradient. *River research and Applications* 2004; 20: 3-23.

Abdelrahman HA, Boyd CE. Effects of mechanical aeration on evaporation rate and water temperature in aquaculture ponds. *Aquaculture Research* 2018; 49: 2184-2192.

Abellan-Schneyder I, Matchado MS, Reitmeier S, Sommer A, Sewald Z, Baumbach J, List M, Neuhaus K. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *Mosphere* 2021; 6

Allen HK, Bayles DO, Looft T, Trachsel J, Bass BE, Alt DP, Bearson S, Nicholson T, Casey TA. Pipeline for amplifying and analyzing amplicons of the V1–V3 region of the 16S rRNA gene. *BMC research notes* 2016; 9: 1-6.

Armstrong J, Kemp P, Kennedy G, Ladle M, Milner N. Habitat requirements of Atlantic salmon and brown trout in rivers and streams. *Fisheries Research* 2003; 62: 143-170.

Arthington AH, Dulvy NK, Gladstone W, Winfield IJ. Fish conservation in freshwater and marine realms: status, threats and management. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 2016; 26: 838-857.

Arzel J, Lopez FXM, Métailler R, Stéphan G, Viau M, Gandemer G, Guillaume J. Effect of dietary lipid on growth performance and body composition of brown trout (*Salmo trutta*) reared in seawater. *Aquaculture* 1994; 123: 361-375.

Attayde JL, Hansson L-A. Fish-mediated nutrient recycling and the trophic cascade in lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2001; 58: 1924-1931.

Austin B. The bacterial microflora of fish, revised. The Scientific World Journal 2006; 6: 931-945.

Austin B, Austin DA, Munn C (2007) Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. Springer

Avershina E, Rudi K. Confusion about the species richness of human gut microbiota. Beneficial microbes 2015; 6: 657-659.

Bagheri T, Hedayati SA, Yavari V, Alizade M, Farzanfar A. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 2008; 8: 43-48.

Bakke-McKellep AM, Sperstad S, Penn M, Salas P, Refstie S, Landsverk T, Ringø E, Krogdahl Å. Effects of dietary soybean meal, inulin and oxytetracycline on gastrointestinal histological characteristics, distal intestine cell proliferation and intestinal microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). 2007;

Behnke RJ. The systematics of salmonid fishes of recently glaciated lakes. Journal of the Fisheries Board of Canada 1972; 29: 639-671.

Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès M-CC, Charles T, Chen X, Cocolin L, Eversole K, Corral GH. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. Microbiome 2020; 8: 1-22.

Bernatchez L. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. Evolution 2001; 55: 351-379.

Bharti R, Grimm DG. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. Briefings in bioinformatics 2021; 22: 178-193.

Bierschenk B, Pander J, Mueller M, Geist J. Fish injury and mortality at pumping stations: a comparison of conventional and fish-friendly pumps. *Marine and Freshwater Research* 2018; 70: 449-458.

Bledsoe JW, Peterson BC, Swanson KS, Small BC. Ontogenetic characterization of the intestinal microbiota of channel catfish through 16S rRNA gene sequencing reveals insights on temporal shifts and the influence of environmental microbes. *PLOS ONE* 2016; 11.

Bohlin T, Sundström L, Johnsson J, Höjesjö J, Pettersson J. Density-dependent growth in brown trout: effects of introducing wild and hatchery fish. *Journal of Animal Ecology* 2002; 71: 683-692.

Böhnisch A, Mittermeier M, Leduc M, Ludwig R. Hot spots and climate trends of meteorological droughts in Europe—assessing the percent of normal index in a single-model initial-condition large ensemble. *Frontiers in Water* 2021; 3: 716621.

Boltaña S, Sanhueza N, Aguilar A, Gallardo-Escarate C, Arriagada G, Valdes JA, Soto D, Quiñones RA. Influences of thermal environment on fish growth. *Ecology and Evolution* 2017; 7: 6814-6825.

Borgwardt F, Unfer G, Auer S, Waldner K, El-Matbouli M, Bechter T. Direct and indirect climate change impacts on brown trout in central Europe: how thermal regimes reinforce physiological stress and support the emergence of diseases. *Frontiers in Environmental Science* 2020; 8: 59.

Boutin S, Bernatchez L, Audet C, Derôme N. Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota. *PLOS ONE* 2013; 8.

Brämick U. Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2013. Annual report of fresh water fisheries and aquaculture 2006.

Brämick U. Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2013. Annual report of fresh water fisheries and aquaculture 2013.

Brämick U. Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2020. Annual report of fresh water fisheries and aquaculture 2020.

Brämick U. Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2020. Annual report of fresh water fisheries and aquaculture 2021.

Brander KM. Global fish production and climate change. Proceedings of the National Academy of Sciences 2007; 104: 19709-19714.

Bray JR, Curtis JT. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. Ecological monographs 1957; 27: 326-349.

Briede I. The prevalent bacterial fish diseases in fish hatcheries of Latvia. Environmental and Experimental Biology 2010; 8: 103-106.

Brooks JFE. European Red List of Freshwater Fishes. Publications Office of the European Union, Luxembourg 2011;

Brown RM, Wiens GD, Salinas I. Analysis of the gut and gill microbiome of resistant and susceptible lines of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & shellfish immunology 2019; 86: 497-506.

Burgos FA, Ray CL, Arias CR. Bacterial diversity and community structure of the intestinal microbiome of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) during ontogenesis. Systematic and applied microbiology 2018; 41: 494-505.

Burkhardt-Holm P, Peter A, Segner H. Decline of fish catch in Switzerland. Aquatic sciences 2002; 64: 36-54.

Burr G, Gatlin III DM, Hume M. Effects of the prebiotics GroBiotic®-A and inulin

on the intestinal microbiota of red drum, *Sciaenops ocellatus*. Journal of the World Aquaculture Society 2009; 40: 440-449.

Burridge L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, Bostick K. Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. Aquaculture 2010; 306: 7-23.

Cadwallader PL (1996) Overview of the impacts of introduced salmonids on Australian native fauna. Australian Nature Conservation Agency Canberra

Cámara-Ruiz M, García-Beltrán JM, Cerezo IM, Balebona MC, Moriñigo MÁ, Esteban MÁ. Immunomodulation and skin microbiota perturbations during an episode of chronic stress in gilthead seabream. Fish & shellfish immunology 2022; 122: 234-245.

Carini P, Marsden PJ, Leff JW, Morgan EE, Strickland MS, Fierer N. Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. Nature microbiology 2016; 2: 1-6.

Carlson JM, Hyde ER, Petrosino JF, Manage AB, Primm TP. The host effects of *Gambusia affinis* with an antibiotic-disrupted microbiome. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 2015; 178: 163-168.

Chabrillón M, Rico R, Balebona M, Moriñigo M. Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Journal of Fish Diseases 2005; 28: 229-237.

CHAMPIGNEULLEC A, GUYOMARD R. Microsatellite analysis of polyandry and spawning site competition in brown trout (*Salmo trutta* L.). Genetics Selection Evolution 2001; 33: 205-222.



Chapuis MP, Benoit L, Galan M. Evaluation of 96-well high-throughput DNA extraction methods for 16S rRNA gene metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 2023;

Chen J, Bittinger K, Charlson ES, Hoffmann C, Lewis J, Wu GD, Collman RG, Bushman FD, Li H. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics* 2012; 28: 2106-2113.

Cherry DS, Dickson KL, Cairns Jr J, Stauffer JR. Preferred, avoided, and lethal temperatures of fish during rising temperature conditions. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 1977; 34: 239-246.

Chu H, Fierer N, Lauber CL, Caporaso JG, Knight R, Grogan P. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental microbiology* 2010; 12: 2998-3006.

Claassen S, du Toit E, Kaba M, Moodley C, Zar HJ, Nicol MP. A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* 2013; 94: 103-110.

Clarke A, Fraser K. Why does metabolism scale with temperature? *Functional ecology* 2004; 18: 243-251.

Colt J, Westers H. Production of gas supersaturation by aeration. *Transactions of the American Fisheries Society* 1982; 111: 342-360.

Cooke SJ, Twardek WM, Lennox RJ, Zolderdo AJ, Bower SD, Gutowsky LF, Danylchuk AJ, Arlinghaus R, Beard D. The nexus of fun and nutrition: Recreational fishing is also about food. *Fish and fisheries* 2018; 19: 201-224.

Corkrey R, Olley J, Ratkowsky D, McMeekin T, Ross T. Universality of thermodynamic constants governing biological growth rates. *PLOS ONE* 2012; 7

Costello C, Ovando D, Clavelle T, Strauss CK, Hilborn R, Melnychuk MC, Branch TA, Gaines SD, Szuwalski CS, Cabral RB. Global fishery prospects under contrasting management regimes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016; 113: 5125-5129.

Cowx IG. Stocking strategies. *Fisheries Management and Ecology* 1994; 1: 15-30.

Crumlish M, Thanh PC, Koesling J, Tung VT, Gravningen K. Experimental challenge studies in Vietnamese catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), exposed to *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases* 2010; 33: 717-722.

Davis LE, Schreck CB. The energetic response to handling stress in juvenile coho salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* 1997; 126: 248-258.

Day T, Pritchard J, Schluter D. A comparison of two sticklebacks. *Evolution* 1994; 48: 1723-1734.

Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current opinion in microbiology* 2011; 14: 251-258.

Dehler CE, Secombes CJ, Martin SA. Seawater transfer alters the intestinal microbiota profiles of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific reports* 2017; 7: 1-11.

Desai AR, Links MG, Collins SA, Mansfield GS, Drew MD, Van Kessel AG, Hill JE. Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2012; 350: 134-142.

DESTATIS S. Land und Forstwirtschaft, Fischerei-Erzeugung in Aquakulturbetrieben 2021. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2022;

Dimitroglou A, Merrifield DL, Spring P, Sweetman J, Moate R, Davies SJ. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 2010; 300: 182-188.

Dulski T, Kozłowski K, Ciesielski S. Habitat and seasonality shape the structure of tench (*Tinca tinca* L.) gut microbiome. *Scientific reports* 2020a; 10: 1-11.

Dulski T, Kujawa R, Godzieba M, Ciesielski SJAS. Effect of Salinity on the Gut Microbiome of Pike Fry (*Esox lucius*). 2020b; 10: 2506.

Dumas S, Blanc J, Audet C, De la Nouee J. The early development of hybrids between brook charr (*Salvelinus fontinalis*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture* 1992; 108: 21-28.

Dupré J, O'Malley MA. Varieties of living things: life at the intersection of lineage and metabolism. 2009;

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *science* 2005; 308: 1635-168.

Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010; 26: 2460-2461.

Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods* 2013; 10: 996-998.

Edgar RC. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *BioRxiv* 2016: 081257.

Effenberger M, Oehm J, Mayr C, Schubert M, Schliewen U. Rote Liste und Gesamtartenliste Bayern Fische und Rundmäuler 2021.

Element G, Engel K, Neufeld JD, Casselman JM, van Coeverden de Groot P, Greer CW, Walker VK. Seasonal habitat drives intestinal microbiome composition in anadromous Arctic char (*Salvelinus alpinus*). Environmental microbiology 2020.

Elliott J. The food of trout (*Salmo trutta*) in a Dartmoor stream. Journal of Applied Ecology 1967: 59-71.

Elliott J. Number of meals in a day, maximum weight of food consumed in a day and maximum rate of feeding for brown trout, *Salmo trutta* L. Freshwater Biology 1975; 5: 287-303.

Elliott J. Spatial distribution and behavioural movements of migratory trout *Salmo trutta* in a Lake District stream. The Journal of Animal Ecology 1986: 907-922.

Elliott J, Elliott J. Temperature requirements of Atlantic salmon *Salmo salar*, brown trout *Salmo trutta* and Arctic charr *Salvelinus alpinus*: predicting the effects of climate change. Journal of Fish Biology 2010; 77: 1793-17817.

Elliott JM (1994) Quantitative ecology and the brown trout. Oxford University Press

Ellis A. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Developmental & Comparative Immunology 2001; 25: 827-839.

Ellis T, North B, Scott A, Bromage N, Porter M, Gadd D. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. Journal of Fish Biology 2002; 61: 493-531.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. . Rome, FAO 2022;

Ferchiou S, Caza F, Villemur R, Labonne J, St-Pierre Y. Skin and Blood Microbial Signatures of Sedentary and Migratory Trout (*Salmo trutta*) of the Kerguelen Islands. *Fishes* 2023; 8: 174.

Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103: 626-631.

FIZ F-I. Daten und Fakten//FIZ.- Band 2021. FIZ, Fisch-Informationszentrum 2021;

Fonds M, Cronie R, Vethaak A, Van der Puyl P. Metabolism, food consumption and growth of plaice (*Pleuronectes platessa*) and flounder (*Platichthys flesus*) in relation to fish size and temperature. *Netherlands Journal of Sea Research* 1992; 29: 127-143.

Forseth T, Jonsson B. The growth and food ration of piscivorous brown trout (*Salmo trutta*). *Functional ecology* 1994: 171-177.

Forterre P. Defining life: the virus viewpoint. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 2010; 40: 151-160.

Foster KR, Schluter J, Coyte KZ, Rakoff-Nahoum S. The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature* 2017; 548: 43-51.

Foyals MJ, Fotedar R, Tay C-Y, Gupta SK. Biological filters regulate water quality, modulate health status, immune indices and gut microbiota of freshwater crayfish, marron (*Cherax cainii*, Austin, 2002). *Chemosphere* 2020; 247

Gajardo K, Rodiles A, Kortner TM, Krogdahl Å, Bakke AM, Merrifield DL, Sørum H. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a basis for comparative gut microbial research. *Scientific reports* 2016; 6: 1-10.

Gallet A, Halary S, Duval C, Huet H, Duperron S, Marie B. Disruption of fish gut microbiota composition and holobiont metabolome by cyanobacterial blooms. *BioRxiv* 2021;

Gatesoupe F-J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2008; 14: 107-114.

Geurden I, Borchert P, Balasubramanian MN, Schrama JW, Dupont-Nivet M, Quillet E, Kaushik SJ, Panserat S, Médale FJPO. The positive impact of the early-feeding of a plant-based diet on its future acceptance and utilisation in rainbow trout. 2013; 8.

Ghosh S, Sinha A, Sahu C. Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. *Aquaculture nutrition* 2008; 14: 289-299.

Giatsis C, Sipkema D, Smidt H, Verreth J, Verdegem M. The colonization dynamics of the gut microbiota in tilapia larvae. *PLOS ONE* 2014; 9.

Giatsis C, Sipkema D, Smidt H, Heilig H, Benvenuti G, Verreth J, Verdegem M. The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific reports* 2015; 5: 1-15.

Gilbert JA, Jansson JK, Knight R (2018) Earth microbiome project and global systems biology. *Am Soc Microbiol*.

Givens CE, Ransom B, Bano N, Hollibaugh JT. Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Marine Ecology Progress Series* 2015; 518: 209-223.

Godon J-J, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and environmental microbiology* 1997; 63: 2802-2813.



Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, Huber I, Nielsen TF. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and environmental microbiology* 1999; 65: 969-973.

Gram L, Løvold T, Nielsen J, Melchiorson J, Spanggaard B. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture* 2001; 199: 1-11.

Grunert KG. Sustainability in the food sector: A consumer behaviour perspective. *International Journal on Food System Dynamics* 2011; 2: 207-218.

Hahn MW. The microbial diversity of inland waters. *Current opinion in biotechnology* 2006; 17: 256-261.

Harris H, Hill C. A Place for Viruses on the Tree of Life. *Frontiers in Microbiology* 2021; 11: 3449.

Hemmingsten W, Martins H (2008) Emerging diseases in mariculture. *Proceedings of the International Workshop on Marine Parasitology: Applied Aspects of Marine Parasitology*. 1-6

Herter C, Kendall AI. The Influence of Dietary Alternations on the Types of Intestinal Flora: Plates I–III (Fellow of the Rockefeller Institute for Medical Research). *Journal of Biological Chemistry* 1910; 7: 203-239.

Hines IS, Santiago-Morales KD, Ferguson CS, Clarington J, Thompson M, Rauschenbach M, Levine U, Drahos D, Aylward FO, Smith SA. Steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed probiotic during the earliest developmental stages have enhanced growth rates and intestinal microbiome bacterial diversity. *Frontiers in Marine Science* 2022; 9

Hoess R, Geist J. Nutrient and fine sediment loading from fish pond drainage to pearl mussel streams—Management implications for highly valuable stream ecosystems. *Journal of Environmental Management* 2022; 302

Hovda MB, Fontanillas R, McGurk C, Obach A, Rosnes JT. Seasonal variations in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research* 2012; 43: 154-159.

HPM. A framework for human microbiome research. *Nature* 2012; 486: 215-221.

Hu C, Huang Z, Liu M, Sun B, Tang L, Chen L. Shift in skin microbiota and immune functions of zebrafish after combined exposure to perfluorobutanesulfonate and probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2021; 218: 112310.

Huber I, Spanggaard B, Appel K, Rossen L, Nielsen T, Gram L. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of applied microbiology* 2004; 96: 117-132.

Illumina Inc. (2008) Multiplexed Sequencing with the Illumina Genome Analyzer System. Analyzer

Illumina Inc. Illumina two-channel SBS sequencing technology. 2016;

Illumina Inc. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. 2017: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>. 19.01.2021.

Illumina Inc. Sequencing: Introduction to Sequencing by Synthesis (SBS). 2021: <https://www.youtube.com/embed/oIJaA6h2bFM?autoplay=1&rel=0>. 21.04.2021.

Infante-Villamil S, Huerlimann R, Jerry DR. Microbiome diversity and dysbiosis in aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 2021; 13: 1077-1096.

Izvekova G. Activity of carbohydrases of symbiotic microflora and their role in processes of digestion of fish and their parasitizing cestodes (on the example of pike and *Triaenophorus nodulosus*). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 2005; 41: 406-414.

Jackson A. The continuing demand for sustainable fishmeal and fish oil in aquaculture diets. *International Aquafeed* 2009; 12: 32-36.

Jackson JE, Raadik TA, Lintermans M, Hammer M. Alien salmonids in Australia: impediments to effective impact management, and future directions. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 2004; 38: 447-455.

Jensen H, Kiljunen M, Amundsen PA. Dietary ontogeny and niche shift to piscivory in lacustrine brown trout *Salmo trutta* revealed by stomach content and stable isotope analyses. *Journal of Fish Biology* 2012; 80: 2448-2462.

Joehnk KD, Huisman J, Sharples J, Sommeijer B, Visser PM, Stroom JM. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global change biology* 2008; 14: 495-512.

Johnsson JI, Forser A. Residence duration influences the outcome of territorial conflicts in brown trout (*Salmo trutta*). *Behavioral ecology and sociobiology* 2002; 51: 282-286.

Jungwirth M, Haidvogel G, Moog O, Muhar S, Schmutz S (2003) *Angewandte Fischökologie an Fließgewässern*. Facultas-Verlag Wien

Kawaguchi Y, Miyasaka H, Genkai-Kato M, Taniguchi Y, Nakano S. Seasonal change in the gastric evacuation rate of rainbow trout feeding on natural prey. *Journal of Fish Biology* 2007; 71: 1873-1878.

Kelly C, Salinas I. Under pressure: interactions between commensal microbiota and the teleost immune system. *Frontiers in Immunology* 2017; 8: 559.

Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, Barnes WM. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic acids research* 2009; 37.

King RC, Stansfield WD, Mulligan PK (2006) *A dictionary of genetics*. Oxford University Press

Kirchhofer A, Breitenstein M, Zaugg B. *Rote Liste Fische und Rundmäuler. Rote Liste der gefährdeten Arten der Schweiz, Ausgabe 2007.*

Klemetsen A, Amundsen PA, Dempson J, Jonsson B, Jonsson N, O'connell M, Mortensen E. Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish* 2003; 12: 1-59.

Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research* 2013; 41

Kobayashi M, Msangi S, Batka M, Vannuccini S, Dey MM, Anderson JL. Fish to 2030: the role and opportunity for aquaculture. *Aquaculture economics & management* 2015; 19: 282-300.

Kottelat M, Freyhof J (2007) *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat

Lagkouvardos I, Joseph D, Kapfhammer M, Giritli S, Horn M, Haller D, Clavel T. IMNGS: a comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Scientific reports* 2016; 6

Lagkouvardos I, Fischer S, Kumar N, Clavel T. Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ* 2017; 5

Langdon A, Crook N, Dantas G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome medicine* 2016; 8: 1-16.

Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepile DE, Thurber RLV, Knight R. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology* 2013; 31: 814-821.

Lantz P-G, Matsson M, Wadström T, Rådström P. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *Journal of Microbiological Methods* 1997; 28: 159-167.

Lavoie C, Courcelle M, Redivo B, Derome N. Structural and compositional mismatch between captive and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) parrs' gut microbiota highlights the relevance of integrating molecular ecology for management and conservation methods. *Evolutionary applications* 2018; 11: 1671-1685.

Legrand TP, Catalano SR, Wos-Oxley ML, Stephens F, Landos M, Bansemer MS, Stone DA, Qin JG, Oxley A. The inner workings of the outer surface: skin and gill microbiota as indicators of changing gut health in yellowtail kingfish. *Frontiers in Microbiology* 2018; 8: 2664.

Legrand TP, Wynne JW, Weyrich LS, Oxley AP. A microbial sea of possibilities: current knowledge and prospects for an improved understanding of the fish microbiome. *Reviews in Aquaculture* 2020; 12: 1101-1134.

Lemanceau P, Blouin M, Muller D, Moëgne-Loccoz Y. Let the core microbiota be functional. *Trends in Plant Science* 2017; 22: 583-595.

Lennon J, Muscarella M, Placella S, Lehmkuhl B. How, when, and where relic DNA affects microbial diversity. *MBio* 2018; 9

Li P, Gatlin III DM. Evaluation of the prebiotic GroBiotic®-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. *Aquaculture* 2005; 248: 197-205.

Li T, Long M, Ji C, Shen Z, Gatesoupe F-J, Zhang X, Zhang Q, Zhang L, Zhao Y, Liu X. Alterations of the gut microbiome of largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) suffering from furunculosis. *Scientific reports* 2016; 6: 1-9.

Li T, Li H, Gatesoupe F-J, She R, Lin Q, Yan X, Li J, Li X. Bacterial signatures of “Red-Operculum” disease in the gut of crucian carp (*Carassius auratus*). *Microbial ecology* 2017; 74: 510-521.

Lim C, Webster CD (2001) Nutrition and fish health. Food Products Press New York

Lin SH, Wu C. Electrochemical removal of nitrite and ammonia for aquaculture. *Water research* 1996; 30: 715-721.

Llewellyn M, Leadbeater S, Garcia C, Sylvain F-E, Custodio M, Ang K, Powell F, Carvalho G, Creer S, Elliot J. Parasitism perturbs the mucosal microbiome of Atlantic Salmon. *Scientific reports* 2017; 7: 1-10.

Llewellyn MS, Boutin S, Hoseinifar SH, Derome N. Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in Microbiology* 2014; 5

Logan CA, Buckley BA. Transcriptomic responses to environmental temperature in eurythermal and stenothermal fishes. *The Journal of experimental biology* 2015; 218: 1915-1924.



Lokesh J, Kiron V, Sipkema D, Fernandes JM, Moum T. Succession of embryonic and the intestinal bacterial communities of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals stage-specific microbial signatures. *MicrobiologyOpen* 2019; 8

Love DC, Fry JP, Cabello F, Good CM, Lunestad BT. Veterinary drug use in United States net pen Salmon aquaculture: Implications for drug use policy. *Aquaculture* 2020; 518.

Lowrey L, Woodhams DC, Tacchi L, Salinas I. Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. *Applied and environmental microbiology* 2015; 81: 6915-6925.

Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and environmental microbiology* 2007; 73: 1576-1585.

Magray AR, Lone SA, Ganai BA, Ahmad F, Hafeez S. The first detection and in vivo pathogenicity characterization of *Saprolegnia delica* from Kashmir Himalayas. *Aquaculture* 2021; 542

Mahious A, Gatesoupe F, Hervi M, Metailler R, Ollevier F. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquaculture International* 2006; 14: 219-229.

Marchesi JR, Ravel J (2015) *The vocabulary of microbiome research: a proposal*. Springer

Marques DA, Lucek K, Sousa VC, Excoffier L, Seehausen O. Admixture between old lineages facilitated contemporary ecological speciation in Lake Constance stickleback. *Nature communications* 2019; 10: 1-14.

Mattocks S, Hall CJ, Jordaan A. Damming, lost connectivity, and the historical role of anadromous fish in freshwater ecosystem dynamics. *BioScience* 2017; 67: 713-728.

McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial resistance: a one health perspective. *Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals 2018*: 521-547.

McFall-Ngai M, Hadfield MG, Bosch TC, Carey HV, Domazet-Lošo T, Douglas AE, Dubilier N, Eberl G, Fukami T, Gilbert SF. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013; 110: 3229-3236.

Meng K, Ding L, Wu S, Wu Z, Cheng G, Zhai X, Sun R, Xu Z. Interactions between commensal microbiota and mucosal immunity in teleost fish during viral infection with SVCV. *Frontiers in Immunology* 2021; 12: 1074.

Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RT, Bøggwald J, Castex M, Ringø E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 2010; 302: 1-18.

Merrifield DL, Rodiles A. The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In: *Mucosal health in aquaculture*: Elsevier 2015: 273-295.

Michl SC, Ratten J-M, Beyer M, Hasler M, LaRoche J, Schulz C. The malleable gut microbiome of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Diet-dependent shifts of bacterial community structures. *PLOS ONE* 2017; 12.

Michl SC, Beyer M, Ratten J-M, Hasler M, LaRoche J, Schulz C. A diet-change modulates the previously established bacterial gut community in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Scientific reports* 2019; 9: 1-12.

Minich JJ, Power C, Melanson M, Knight R, Webber C, Rough K, Bott NJ, Nowak B, Allen EE. The Southern Bluefin *Tuna mucosal* microbiome is influenced by husbandry method, net pen location, and anti-parasite treatment. *Frontiers in Microbiology* 2020; 11: 2015.

Minniti G, Hagen LH, Porcellato D, Jørgensen SM, Pope PB, Vaaje-Kolstad G. The skin-mucus microbial community of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Microbiology* 2017; 8: 2043.

Mohammed HH, Arias CR. Potassium permanganate elicits a shift of the external fish microbiome and increases host susceptibility to columnaris disease. *Veterinary Research* 2015; 46: 1-13.

Moreira D, López-García P. Ten reasons to exclude viruses from the tree of life. *Nature Reviews Microbiology* 2009; 7: 306-311.

Moriarty M, Ives SC, Murphy JM, Murray AG. Modelling parasite impacts of aquaculture on wild fish: The case of the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) on out-migrating wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt. *Preventive Veterinary Medicine* 2023; 214: 105888.

Mueller M, Pander J, Geist J. Comprehensive analysis of > 30 years of data on stream fish population trends and conservation status in Bavaria, Germany. *Biological conservation* 2018; 226: 311-20.

Mueller M, Bierschenk AM, Bierschenk BM, Pander J, Geist J. Effects of multiple stressors on the distribution of fish communities in 203 headwater streams of Rhine, Elbe and Danube. *Science of The Total Environment* 2020; 703: 134523.

Nations U. World population prospects 2019. Department of Economic and Social Affairs 2019; 141

Nayak SK. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research* 2010; 41: 1553-1573.

Nelson JS, Grande TC, Wilson MV (2016) *Fishes of the World*. John Wiley & Sons

Neu AT, Allen EE, Roy K. Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2021; 118.

Neuman C, Hatje E, Zarkasi KZ, Smullen R, Bowman JP, Katouli M. The effect of diet and environmental temperature on the faecal microbiota of farmed Tasmanian Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research* 2016; 47: 660-672.

Nikouli E, Meziti A, Antonopoulou E, Mente E, Kormas KA. Host-associated bacterial succession during the early embryonic stages and first feeding in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Genes* 2019; 10: 483.

Nusbaum K, Morrison E. *Edwardsiella ictaluri* bacteraemia elicits shedding of *Aeromonas hydrophila* complex in latently infected channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases* 2002; 25: 343-350.

Ojanguren A, Brana F. Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. *Journal of Fish Biology* 2003; 62: 580-590.

Olsen GJ, Woese CR, Overbeek R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *Journal of bacteriology* 1994; 176: 1-6.

Olsen RE, Sundell K, Mayhew TM, Myklebust R, Ringø E. Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture* 2005; 250: 480-495.

Olsen RL, Hasan MR. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology* 2012; 27: 120-128.

Ormerod SJ, Dobson M, Hildrew AG, Townsend C (2010) Multiple stressors in freshwater ecosystems. Wiley Online Library

Pagel T, Arlinghaus R. 1 Fischbesatz und Fischbiodiversität in der deutschen Angelfischerei. Hand in Hand für eine nachhaltige Angelfischerei. R. ARLINGHAUS, CYRUS, E.-M., ESCHBACH, E. et al. Berlin, Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB) im Forschungsverbund Berlin eV Berichte des IGB 2015: 19-31.

Pakkasmaa S, Piironen J. Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 2001; 72: 231-239.

Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, Kobayashi T, Satoh S, Sugita H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 2005; 243: 241-254.

Payne CJ, Turnbull JF, MacKenzie S, Crumlish M. The effect of oxytetracycline treatment on the gut microbiome community dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) over time. *Aquaculture* 2022; 560: 738559.

Peatman E, Lange M, Zhao H, Beck BH. Physiology and immunology of mucosal barriers in catfish (*Ictalurus spp.*). *Tissue barriers* 2015; 3.

Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C. The NIH human microbiome project. *Genome research* 2009; 19: 2317-23.

Pirog R, Van Pelt T, Enshayan K, Cook E. Food, fuel, and freeways: An Iowa perspective on how far food travels, fuel usage, and greenhouse gas emissions. Leopold Center for Sustainable Agriculture 2001; 209

Pita L, Rix L, Slaby BM, Franke A, Hentschel U. The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome* 2018; 6: 1-18.

Pomeroy LR, Wiebe WJ. Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 2001; 23: 187-204.

Porter TM, Hajibabaei M. Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular ecology* 2018; 27: 313-338.

Prodan A, Tremaroli V, Brolin H, Zwinderman AH, Nieuwdorp M, Levin E. Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLOS ONE* 2020; 15.

Ramírez C, Romero J. The microbiome of *Seriola lalandi* of wild and aquaculture origin reveals differences in composition and potential function. *Frontiers in Microbiology* 2017a; 8: 1844.

Ramírez C, Romero J. Fine flounder (*Paralichthys adspersus*) microbiome showed important differences between wild and reared specimens. *Frontiers in Microbiology* 2017b; 8: 271.

Ramos M, Weber B, Gonçalves J, Santos G, Rema P, Ozório R. Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2013; 166: 302-307.

Razak SA, Griffin M, Mischke C, Bosworth B, Waldbieser G, Wise D, Marsh T, Scribner K. Biotic and abiotic factors influencing channel catfish egg and gut microbiome dynamics during early life stages. *Aquaculture* 2019; 498: 556-567.

Réalis-Doyelle E, Pasquet A, De Charleroy D, Fontaine P, Teletchea F. Strong effects of temperature on the early life stages of a cold stenothermal fish species, brown trout (*Salmo trutta* L.). PLOS ONE 2016; 11.

Refstie S, Bakke-McKellep AM, Penn MH, Sundby A, Shearer KD, Krogdahl Å. Capacity for digestive hydrolysis and amino acid absorption in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with soybean meal or inulin with or without addition of antibiotics. Aquaculture 2006; 261: 392-406.

Reitmeier S, Kiessling S, Neuhaus K, Haller D. Comparing circadian rhythmicity in the human gut microbiome. STAR protocols 2020; 1: 100148.

Reza A, Abdolmajid H, Abbas M, Abdolmohammad AK. Effect of dietary prebiotic inulin on growth performance, intestinal microflora, body composition and hematological parameters of juvenile beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). Journal of the World Aquaculture Society 2009; 40: 771-779.

Riedl C, Peter A. Timing of brown trout spawning in Alpine rivers with special consideration of egg burial depth. Ecology of Freshwater Fish 2013; 22: 384-397.

Rogall ET, Jacob S, Triebskorn R, Schwartz T. The impact of the anti-diabetic drug metformin on the intestinal microbiome of larval brown trout (*Salmo trutta* f. fario). Environmental Sciences Europe 2020; 32: 1-14.

Rosado D, Xavier R, Cable J, Severino R, Tarroso P, Pérez-Losada M. Longitudinal sampling of external mucosae in farmed European seabass reveals the impact of water temperature on bacterial dynamics. ISME Communications 2021; 1: 1-11.

Rudi K, Angell IL, Pope PB, Vik JO, Sandve SR, Snipen L-G. Stable core gut microbiota across the freshwater-to-saltwater transition for farmed Atlantic salmon. Applied and environmental microbiology 2018; 84.



Saha S, Roy RN, Sen SK, Ray AK. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *Aquaculture Research* 2006; 37: 380-8.

Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, Turner P, Parkhill J, Loman NJ, Walker AW. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC biology* 2014; 12: 1-12.

Sánchez-Hernández J, Vieira-Lanero R, Servia MJ, Cobo F. First feeding diet of young brown trout fry in a temperate area: disentangling constraints and food selection. *Hydrobiologia* 2011; 663: 109-119.

Sánchez-Hernández J, Cobo F. Summer differences in behavioural feeding habits and use of feeding habitat among brown trout (Pisces) age classes in a temperate area. *Italian Journal of Zoology* 2012; 79: 468-478.

Sandlund OT, Gunnarsson K, Jónasson PM, Jonsson B, Lindem T, Magnússon KP, Malmquist HJ, Sigurjónsdóttir H, Skúlason S, Snorrason SS. The arctic charr *Salvelinus alpinus* in Thingvallavatn. *Oikos* 1992: 305-351.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1977; 74: 5463-7.

Sapkota A, Sapkota AR, Kucharski M, Burke J, McKenzie S, Walker P, Lawrence R. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environment international* 2008; 34: 1215-1226.

Schwarz FJ (2017) Lehrbuch der Teichwirtschaft 5., neubearbeitete Auflage., Lukowicz, M. v. (Hrsg.) , Schäfferpoclaus, W.

Sealey WM, Barrows FT, Johansen KA, Overturf K, LaPatra SE, Hardy RW. Evaluation of the ability of partially autolyzed yeast and Grobiotic-A to improve disease resistance in rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture* 2007; 69: 400-406.

Segura PA, François M, Gagnon C, Sauvé S. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environmental health perspectives* 2009; 117: 675-684.

Shade A, Handelsman J. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environmental microbiology* 2012; 14: 4-12.

Shannon CE. A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE mobile computing and communications review* 2001; 5: 3-55.

Sierra MA, Li Q, Pushalkar S, Paul B, Sandoval TA, Kamer AR, Corby P, Guo Y, Ruff RR, Alekseyenko AV. The influences of bioinformatics tools and reference databases in analyzing the human oral microbial community. *Genes* 2020; 11: 878.

Simon J-C, Marchesi JR, Mougél C, Selosse M-A. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome* 2019; 7: 1-5.

Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature* 1949; 163: 688.

Skoglund H, Barlaup B. Feeding pattern and diet of first feeding brown trout fry under natural conditions. *Journal of Fish Biology* 2006; 68: 507-521.

Sørum H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin* 2005: 213-238.

Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Nielsen T, Appel K, Gram L. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* 2000; 182: 1-15.

Star B, Haverkamp TH, Jentoft S, Jakobsen KS. Next generation sequencing shows high variation of the intestinal microbial species composition in Atlantic cod caught at a single location. *BMC microbiology* 2013; 13: 1-6.

Staykov Y, Spring P, Denev S, Sweetman J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International* 2007; 15: 153-161.

Steffens W. Great Cormorant—substantial danger to fish populations and fishery in Europe. *Bulgarian journal of agricultural science* 2010; 16: 322-331.

Stephens WZ, Burns AR, Stagaman K, Wong S, Rawls JF, Guillemin K, Bohannon BJ. The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. *The ISME journal* 2016; 10: 644-654.

Sterba G (1959) Süßwasserfische aus aller Welt. Urania-Verlag

Stewart EJ. Growing unculturable bacteria. *Journal of bacteriology* 2012; 194: 4151-4160.

Storch V, Welsch U (2004) Kükenthal - Zoologisches Praktikum

Sugita H, Miyajima C, Kobiki Y, Deguchi Y. The daily fluctuation and inter-individual variation of the faecal flora of carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology* 1990; 36: 103-105.

Sugita H, Hirose Y, Matsuo N, Deguchi Y. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 1998; 165: 269-280.

Sullam KE, Essinger SD, Lozupone CA, O'CONNOR MP, Rosen GL, Knight R, Kilham SS, Russell JA. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular ecology* 2012; 21: 3363-3378.

Swift D. The annual growth-rate cycle in brown trout (*Salmo trutta* Linn.) and its cause. *Journal of Experimental Biology* 1961; 38: 595-604.

Sylvain F-É, Cheaib B, Llewellyn M, Correia TG, Fagundes DB, Val AL, Derome N. pH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Scientific reports* 2016; 6: 1-10.

Talwar C, Nagar S, Lal R, Negi RK. Fish gut microbiome: current approaches and future perspectives. *Indian journal of microbiology* 2018; 58: 397-414.

Tan B, Ng CM, Nshimiyimana JP, Loh L-L, Gin KY-H, Thompson JR. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Frontiers in Microbiology* 2015; 6: 1027.

Tarnecki AM, Brennan NP, Schloesser RW, Rhody NR. Shifts in the skin-associated microbiota of hatchery-reared common snook *Centropomus undecimalis* during acclimation to the wild. *Microbial ecology* 2019; 77: 770-781.

Tuomisto H. A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography* 2010a; 33: 2-22.

Tuomisto H. A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 2. Quantifying beta diversity and related phenomena. *Ecography* 2010b; 33: 23-45.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007; 449: 804-810.

Vasemägi A, Visse M, Kisand V. Effect of environmental factors and an emerging parasitic disease on gut microbiome of wild salmonid fish. *Msphere* 2017; 2.

Vázquez JA, González M, Murado M. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 2005; 245: 149-161.

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *science* 2004: 66-74.

Větrovský T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLOS ONE* 2013; 8.

Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clinical Chemistry* 2009; 55: 641-658.

Vøllestad LA, Serbezov D, Bass A, Bernatchez L, Olsen EM, Taugbøl A. Small-scale dispersal and population structure in stream-living brown trout (*Salmo trutta*) inferred by mark-recapture, pedigree reconstruction, and population genetics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2012; 69: 1513-1524.

Watson SB, McCauley E, Downing JA. Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnology and Oceanography* 1997; 42: 487-495.

Webster UTM, Consuegra S, Hitchings M, Garcia de Leaniz C. Interpopulation variation in the Atlantic salmon microbiome reflects environmental and genetic diversity. *Applied and environmental microbiology* 2018; 84.

Webster UTM, Rodriguez-Barreto D, Castaldo G, Gough P, Consuegra S, Garcia de Leaniz C. Environmental plasticity and colonisation history in the Atlantic salmon microbiome: a translocation experiment. *Molecular ecology* 2020; 29: 886-898.

Wedekind C, Gessner M, Vazquez F, Maerki M, Steiner D. Elevated resource availability sufficient to turn opportunistic into virulent fish pathogens. *Ecology* 2010; 91: 1251-1256.

Whittaker RH. Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological monographs* 1960; 30: 279-338.

Whittaker RJ, Willis KJ, Field R. Scale and species richness: towards a general, hierarchical theory of species diversity. *Journal of biogeography* 2001; 28: 453-470.

Wilkins LG, Rogivue A, Schütz F, Fumagalli L, Wedekind C. Increased diversity of egg-associated bacteria on brown trout (*Salmo trutta*) at elevated temperatures. *Scientific reports* 2015; 5: 1-15.

Wilkins LG, Fumagalli L, Wedekind C. Effects of host genetics and environment on egg-associated microbiotas in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular ecology* 2016; 25: 4930-4945.

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990; 87: 4576-4579.

Wong S, Waldrop T, Summerfelt S, Davidson J, Barrows F, Kenney PB, Welch T, Wiens GD, Snekvik K, Rawls JFJA, microbiology e. Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density. *Applied and environmental microbiology* 2013; 79: 4974-4984.

Wong S, Stephens WZ, Burns AR, Stagaman K, David LA, Bohannan BJ, Guillemin K, Rawls JF. Ontogenetic differences in dietary fat influence microbiota assembly in the zebrafish gut. *MBio* 2015; 6.

Wysocki LE, Montey K, Popper AN. The influence of ambient temperature and thermal acclimation on hearing in a eurythermal and a stenothermal otophysan fish. *Journal of Experimental Biology* 2009; 212: 3091-3099.

Xavier R, Pereira A, Pagan A, Hendrick GC, Nicholson MD, Rosado D, Soares MC, Pérez-Losada M, Sikkil PC. The effects of environment and ontogeny on the skin microbiome of two *Stegastes* damselfishes (Pomacentridae) from the eastern Caribbean Sea. *Marine Biology* 2020; 167: 1-12.

Zarkasi KZ, Abell GC, Taylor RS, Neuman C, Hatje E, Tamplin ML, Katouli M, Bowman JP. Pyrosequencing-based characterization of gastrointestinal bacteria of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) within a commercial mariculture system. *Journal of applied microbiology* 2014; 117: 18-27.

Zhang X, Ding L, Yu Y, Kong W, Yin Y, Huang Z, Zhang X, Xu Z. The change of teleost skin commensal microbiota is associated with skin mucosal transcriptomic responses during parasitic infection by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Frontiers in Immunology* 2018; 9: 2972.

Zhang Z, Yu Y, Jiang Y, Wang Y, Liao M, Rong X, Liu Q. The intestine of artificially bred larval turbot (*Scophthalmus maximus*) contains a stable core group of microbiota. *Archives of Microbiology* 2020; 202: 2619-2628.

Zorn TG. Ecology and management of stream-resident brown trout in Michigan (USA). *Brown trout: biology, ecology and management* 2017: 667-696.



## VIII. ANHANG

### SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 11, 2022

This Agreement between Ms. Katharina Keiz ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5345930152620
License date	Jul 11, 2022
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Microbiology
Licensed Content Title	Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences
Licensed Content Author	Pablo Yarza et al
Licensed Content Date	Aug 14, 2014
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
High-res required	n/a
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Untersuchungen zur Veränderung des Fischmikrobioms von Satzforellen auf der Fischkörperoberfläche und im Verdauungstrakt bei Bestandsvermischung und Besatz
Institution name	Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München
Expected presentation date	Mar 2023
Portions	Figure 1: Variable regions of the 16S ribosomal RNA
Requestor Location	Ms. Katharina Keiz Veterinärstraße 13  München, 80539 Germany Attn: Ms. Katharina Keiz
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH  
Terms and Conditions

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the Licence) between you and Springer Nature Customer Service Centre GmbH (the Licensor). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (Licensed Material), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

#### 1. Grant of License

1. 1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in

### Abbildung A 1: Nutzungsrecht für Abbildung 6: 16S ribosomale RNA

## IX. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich dem Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, der Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München dafür danken, dass mir die Möglichkeit gegeben wurde, in diesem Themenbereich zu promovieren. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Straubinger für seine Unterstützung und Betreuung, sowie die spannenden wissenschaftlichen Diskussionen, die mir fachlich immer wieder neuen Input zu meinen Experimenten geliefert haben. Ich habe viel gelernt, auch über die Grenzen meines Themas hinaus.

Ich danke meinem Betreuer Dr. Sebastian Ulrich dafür, dass er mich an den Lehrstuhl geholt hat und mich bei den Probenahmen unterstützt hat. Dr. Jasmin Wenderlein danke ich für ihren fachlichen Input und die Unterstützung bei der Erstellung der Veröffentlichung. Mein Dank gilt überdies all meinen Kollegen am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, die mir während der Dissertation zur Seite gestanden haben. Eure Unterstützung, sei es bei Probenahmen oder beim Kaffee nach jeder kleinen Krise, weil meine Sequenzierungsergebnisse immer noch nicht da waren, haben mit sehr geholfen. Insbesondere sind hier zu nennen Eva, Stephanie, Christoph, Katha T., Katharina L., Sebastian S., Conny und Anna. Auch möchte ich den Sekretärinnen Jenny und Dani danken, ebenso wie Gunther der immer dafür gesorgt hat, dass ich flüssigen Stickstoff zur Verfügung hatte.

Neben meinem Kollegen von der LMU möchte ich mich bei den Mitarbeitern des ZIELs bedanken, die sich meinen nicht einfach zu bearbeitenden Proben gewidmet haben. Besonders hervorgehoben sei hierbei auch Ilias Lagouvardos, der nicht nur die bioinformatische Grundlage für Auswertung der Mikrobiomdaten geschaffen hat, sondern auch bei Bedarf für Rat zur Verfügung stand.

Herrn Dr. Wedekind und Herrn Dr. Born danke ich für Ihre fachliche Unterstützung und für die Bereitstellung der Versuchsfische und der Räumlichkeiten. Mein Dank gilt überdies den Herren Strohmeier, Keferloher und Streicher und allen beteiligten Fischwirten, ohne deren Einsatz diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Zenner danke ich für seinen Vermittlung der Grundkenntnisse von Acrobat Illustrator und die netten Gespräche.

Ich danke dem Landesfischereiverband Bayern, weil er mir ermöglicht hat, für die Dauer meiner Promotion meine Stundenanzahl zu reduzieren. Mein besonderer

Dank gilt hierbei Frau Dr. Elisabeth Mathes, die nicht nur Verständnis hatte, wenn ich manchmal völlig fertig im Büro saß, sondern mir auch immer mit aufmunternden Worten zur Seite stand. Ich bin froh, dich als meine Chefin zu haben.

Ich danke meinen Freunden, die alle keine Ahnung haben, was ich da eigentlich tue, die aber geduldig zugehört haben, wenn ich davon berichtete.

Mein Opa hat zum Zeitpunkt meiner Promotion nicht mehr gelebt, aber es hätte ihn so glücklich gemacht, dass ich in diesem Bereich promoviere. Er hat mein Interesse an naturwissenschaftlichen Themen immer gefördert und ich bin sehr dankbar für seinen Zuspruch.

Besonders danken möchte ich abschließend meinen Eltern. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mir immer ein Gefühl der Sicherheit gebt. Dieses Gefühl eures Rückhalts, hat mir mein Leben so viel einfacher gemacht.