

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

Kontinuierliche Kultivierung von *Paramecium caudatum* im Hefe-Weizen- und
E. coli-Medium
Bachelorarbeit



Autor: Julian Kreiner
Bachelorstudiengang UI18
Abgabedatum: 13.01.2022
Studiengang: Umweltingenieur

Korrektor 1: Dr. Dominik Refardt
Forschungsgruppe Aquakultur-Systeme
Zürcher Hochschule für angewandte
Wissenschaften
8820 Wädenswil

Korrektor 2: Tschudi Fridolin
Forschungsgruppe Aquakultur-Systeme
Zürcher Hochschule für angewandte
Wissenschaften
8820 Wädenswil

Impressum

Institut:

Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften
Institut für Umwelt und natürliche Ressourcen
Grüntalstrasse 14
8820 Wädenswil

Autor:

Julian Kreiner


Zitiervorschlag

Bachelorarbeit:

Kreiner, J. (2022). Kontinuierliche Produktion von *Paramecium caudatum* im Hefe-Weizen-Medium und *E. coli*-Medium. Bachelorarbeit, ZHAW Wädenswil, unveröffentlicht.

Keywords

Massenproduktion, *Paramecium caudatum*, Aquakultur, *Escherichia coli*, Hefe-Weizen-Medium, Bakterien

Zusammenfassung

Im Jahre 2018 galten 33 % der weltweiten Fischbestände als überfischt, wodurch eine natürliche Versorgung immer schwieriger wird und die Züchtung in Aquakulturen weiter an Bedeutung gewinnt. Für die Züchtung werden jedoch grosse Mengen an Lebendfutter der Gattung *Artemia* benötigt. Diese stammen zum Grossteil, als natürliche Ressource, aus dem Great Salt Lake. Durch Umwelteinflüsse sinkt der Ertrag aus dem See stetig, wobei die Nachfrage nach neuen *Artemia*-Zysten weiter ansteigt und eine Alternative wie lebendes Zooplankton immer wichtiger wird. Sie eignen sich auch für kleinere Fischarten und müssen nicht aus Eiern inkubiert werden. Die Arbeit konzentriert sich auf die Kultivierung von *Paramecium caudatum* mit einem Hefe-Weizen-Medium und *Escherichia coli* C600. Mittels einer regelmässigen Fütterung soll eine kontinuierliche und stabile Produktion der Pantoffeltierchen erreicht werden. Zusätzlich zur Anzahl an Pantoffeltierchen und der Bakterienanzahl wurden die Umweltparameter pH-Wert, Temperatur, elektrische Leitfähigkeit, Sauerstoffkonzentration und -sättigung aufgenommen. Mit dem Hefe-Weizen-Medium wurden maximale Populationsdichten von 47 Ind./ml erreicht, mit 1 ml *E. coli*-Medium waren Dichten von 140 Ind./ml möglich. Alle Kulturen wiesen einen ähnlichen Verlauf auf, mit einem Anstieg der Population bis zum sechsten Tag und einem nachfolgenden Abfall zum Ende des Experimentes. Die Bakterienanzahl im Hefe-Weizen-Medium stieg zu Beginn auf einen Wert von $1.39 \cdot 10^8$ KBE/ml an, brach dann ein und erreichte am achten Tag die tiefsten Werte. Der Verlauf ähnelt der Entwicklung der Paramecienpopulationen, zum Zeitpunkt der tiefsten Bakterienzahl ging auch bei diesen die Populationsdichte zurück. Im *E. coli*-Medium wurde eine konstante Anzahl von $3.6 \cdot 10^8$ KBE/ml erreicht. Eine Kultivierung von *P. caudatum* mittels Fütterung der beiden Medien ist möglich, aber ineffizient. Die erreichten Populationsdichten waren im Vergleich zu Kulturen, welche direkt im Hefe-Weizen-Medium kultiviert wurden, um einiges niedriger. Dies lässt sich auf die einbrechende Bakterienzahl im Hefe-Weizen-Medium zurückführen und es kann davon ausgegangen werden, dass die Populationen aufgrund von Futtermangel einbrachen. Die Kultivierung mit *E. coli* erwies sich als sehr unzuverlässig und wies sehr unterschiedliche Populationsdichten auf, wobei nur in einem von drei Replikaten verwendbare Resultate erzielt werden konnten.

Abstract

In 2018, 33% of the world's fish stocks were considered overfished, making natural supply increasingly difficult and breeding in aquacultures more and more important. However, large quantities of live feed of the genus *Artemia* are required for breeding. Most of these come from the Great Salt Lake as a natural resource. Due to environmental influences, the yield from the lake is steadily decreasing. The demand for new *Artemia* cysts continues to increase and an alternative such as live zooplankton is becoming more and more important. They are also suitable for smaller fish species and do not need to be incubated from eggs. This work focuses on the cultivation of *Paramecium caudatum* with a yeast-wheat medium and *Escherichia coli* C600. By means of regular feeding, a continuous and stable production of *paramecium* should be achieved. In addition to the number of *paramecia* and the number of bacteria, the environmental parameters pH, temperature, electrical conductivity, oxygen concentration and saturation were recorded. Maximum population densities of 47 Ind./ml were achieved with the yeast-wheat-medium, and densities of 140 Ind./ml were possible with 1 ml of *E. coli*-medium. All cultures showed a similar progression, with an increase in population by the sixth day and a subsequent decrease by the end of the experiment. The bacterial count in the yeast-wheat-medium increased to a value of $1.39 \cdot 10^8$ CFU/ml at the beginning, then collapsed and reached the lowest values on the eighth day. The course is similar to the development of the *paramecia* populations; at the time of the lowest bacterial count, the population density also decreased in these. A constant number of $3.6 \cdot 10^8$ CFU/ml was reached in the *E. coli*-medium. Cultivation of *P. caudatum* by feeding the two media is possible but inefficient. The achieved population densities were much lower compared to cultures cultivated directly in the yeast-wheat-medium. This can be attributed to the collapsing bacterial numbers in the yeast-wheat-medium and it can be assumed that the populations collapsed due to lack of feed. Cultivation with *E. coli* proved to be very unreliable and showed highly variable population densities, with usable results obtained in only one of three replicates.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Paramecium caudatum</i>	2
1.2	Einflussfaktoren auf das Wachstum	4
2	Material und Methoden	6
2.1	Futtermedien	6
2.2	Kultivierung von <i>P. caudatum</i> mittels Fütterung eines Hefe-Weizen-Mediums	7
2.2.1	Aufbau	7
2.2.2	Ablauf	8
2.3	Kultivierung von <i>P. caudatum</i> mittels Fütterung von <i>Escherichia coli</i> C600	9
2.3.1	Aufbau	9
2.3.2	Ablauf	9
2.4	Analytik und Laborarbeiten	10
2.4.1	Ausplattieren der Bakterien	10
2.4.2	Zählen der Pantoffeltierchen	11
2.4.3	Messungen mit der Multisonde	11
3	Resultate	11
3.1	Kultivierung von <i>P. caudatum</i> mittels Fütterung eines Hefe-Weizen-Mediums	11
3.2	Kultivierung von <i>P. caudatum</i> mittels Fütterung von <i>Escherichia coli</i> C600	15
4	Diskussion	19
5	Fazit	24
6	Ausblick und Hinweise für zukünftige Experimente	24
7	Danksagung	25
	Literaturverzeichnis	25
	Anhang	28

1 Einleitung

Der Fisch dient den Menschen schon seit Jahrtausenden als Nahrung und für 3 Mrd. Menschen ist er die primäre Eiweissquelle (Meske, 1971; Hofrichter et al., 2020). Dies führte im Jahre 2019 zu einem weltweiten Konsum von 158.3 Millionen Tonnen Fisch (Statista, 2022). Durch die hohe Nachfrage und unkontrollierte Überfischung der Weltmeere gehen die Fischbestände jedoch drastisch zurück, im Jahr 2017 galten ca. 34.2 % der weltweiten Bestände als überfischt (FAO, 2020). Dadurch erlangte die künstliche und kontrollierte Züchtung von Fischen zunehmend an Bedeutung. Heutzutage ist die Aquakultur der am schnellsten wachsende Sektor innerhalb der Tierproduktion. Die Aufzucht vom Ei bis zum marktfähigen Individuum ist jedoch sehr aufwendig und noch nicht für alle Arten möglich (Hofrichter et al., 2020). Jungfischlarven sind während ihrer Aufzucht oftmals auf Lebendfutter angewiesen, welches in Form von Salzwasserkrebsen der Gattung *Artemia* verfüttert wird. Obwohl es sich dabei um keine natürliche Ernährung handelt, hat sie sich aufgrund der einfachen Handhabung und der hohen Nährwerte in der Aufzucht etabliert (Lavens & Sorgeloos, 2000). Seit der Entwicklung kommerzieller Meeresfischzuchten im Jahre 1970 wuchs der Bedarf dieser *Artemia*-Zysten (Eier der Salzwasserkrebse) auf 800 Tonnen pro Jahr an, dies macht etwa 40 % des gesamten Futtermittelbedarfs für die frühen Stadien in Aquakulturen aus (Sorgeloos et al., 2001). Die Eier sind im dormanten Zustand lange haltbar und können innerhalb 24 h zu Nauplius inkubiert und so verfüttert werden (Lavens & Sorgeloos, 2000). Sie werden aus natürlichen Gewässern, hauptsächlich aus dem Great Salt Lake in Utah gewonnen, getrocknet und verkauft (Lavens & Sorgeloos, 2000; Hofrichter et al., 2020). Durch den stetig steigenden Bedarf der Brutanstalten, den sinkenden Ernten aus dem Great Salt Lake, bedingt durch Umweltveränderungen, und dem Fehlen weiterer natürlicher Quellen, steigt der Preis für *Artemia*-Zysten stetig an. Weiter variieren die Zysten stark in ihrer Qualität in Bezug auf die Schlupfrate und Nährstoffzusammensetzung, und zwar nicht nur zwischen den verschiedenen Arten, sondern auch zwischen Chargen aus demselben Standort (Lavens & Sorgeloos, 2000). Als weitere Variante neben den Salzwasserkrebsen eignen sich lebende Zooplankton wie die Rädertierchen oder Pantoffeltierchen als Nahrungsquelle für Larven und juvenile Fische. Gegenüber *Artemia* haben sie den Vorteil, dass sie sich für Fischarten, deren Mäuler zu klein für *Artemia* sind, eignen (Nagarajan et al., 2021). Da weiter keine Verbesserung der Situation bei der Verfügbarkeit von *Artemia*-Zysten aus dem Great Salt Lake zu erwarten ist, werden kommerziell nutzbare Kultivierungsmethoden von lebendem Zooplankton immer wichtiger, um den wachsenden Bedarf an Lebendfutter in der Aquakultur zu decken (Lavens & Sorgeloos, 2000; Sorgeloos et al., 2001). Eine Kultivierung von *P. caudatum* im Hefe-Weizen-Medium und das Erreichen von hohen Populationsdichten ist möglich. Frühere Studien zeigten, dass die Art ab dem sechsten Tag ihre höchste Populationsdichte erreichte und diese über eine Spanne von max. 26 Tagen aufrecht erhalten werden konnte (Cotter, 2018; Baier, 2020). Diese Arbeit konzentriert sich daher auf die Kultivierung von *P. caudatum* mit einem extern produziertem Hefe-Weizen-Medium und einem Medium bestehend aus *E. coli* C600. Beim Hefe-Weizen-Medium wird somit die kontinuierliche Kultivierungsmethode wie bei Cotter (2018) mit

dem Versuchsaufbau und den grossen Volumina von Baier (2020) kombiniert, um eine kontinuierliche Kultivierung in grossen Volumina zu ermöglichen. Dies soll hauptsächlich mit einer regelmässigen Fütterung der Futtermedien erreicht werden, wodurch das Populationswachstum von *P. caudatum* stabilisiert werden soll. Eine weitere Stabilisierung der Population soll durch die Entnahme an Medium aus den Kulturen, nach Erreichen der höchsten Populationsdichten, erreicht werden. Da eine Kultivierung mittels Hefe-Weizen-Medium jedoch nicht verlässlich war und nicht die gewünschten Resultate lieferte, wurde eine weitere Fütterung mittels einer Reinkultur an *E. coli* C600 durchgeführt. Dabei wurde der Ansatz verfolgt, dass Paramecien mit einer spezifischen Art an Bakterien gefüttert werden können (Hargitt & Fray, 1917; Wichterman, 1986). Zudem war es somit möglich pro Fütterung immer die gleiche Anzahl an Bakterien zu verfüttern, wodurch den Paramecien jeweils die gleiche Menge an Nahrung zur Verfügung stand.

1.1 *Paramecium caudatum*

Das Pantoffeltierchen *P. caudatum* wurde 1834 von Ehrenberg entdeckt und klassifiziert (Wichterman, 1986; Schoch et al., 2020). Weltweit ist die Art in Teichen, Tümpeln, Seen, Flüssen und weiteren Gewässern mit stehendem Wasser, welche verrottendes Material beinhalten, verbreitet und ernährt sich von den dort vorkommenden Bakterien (Estabrook, 1910; Wichterman, 1986; Sathe, 2011). Aufgrund ihrer Anpassungsfähigkeit und einfachen Züchtbarkeit werden sie bevorzugt als Versuchstiere für Medikamente und anderen Wirkstoffe eingesetzt. Der Organismus hat dabei entscheidende Vorteile gegenüber grösseren Tieren, welche in ihrer Aufzucht kostspieliger und zeitaufwendiger sind. Ausgehend von einigen einzelnen Exemplaren ist es innerhalb kurzer Zeit möglich, eine stammesreine Kultur mit einer enormen Anzahl an genetisch reinen Paramecien zu produzieren. Pro Tag sind vier oder mehr Zellgenerationen möglich und die Aufrechterhaltung der Kultur erfolgt mit vergleichsweise wenig Aufwand und Platzbedarf. Zudem ist es möglich sie als Reinkultur zu züchten und zu halten (Wichterman, 1986). Eine weitere Verwendung finden Paramecien in der biologischen Schädlingsbekämpfung. Dabei eignen sie sich optimal als Futter für das erste Larvenstadium der Libellenart *Crocothemis servillia*, welche ausgewachsen wiederum ein gutes Mittel zur biologischen Bekämpfung von Stechmücken ist (Sathe, 2011).

Der Körper der *P. caudatum* ist zigarren- oder spindelförmig, mit einem stumpf abgerundeten vorderen und einem etwas spitz oder konischen hinteren Ende. In der Regel sind sie zwischen 170 und 290 µm gross. Ihr Körper wird von einer Plasmamembrane umhüllt, welche vollständig mit länglichen Reihen von einheitlich langen Wimpern bedeckt ist. Ausnahmen bilden lediglich die wesentlich längeren Wimpern an der äusseren hinteren Spitze des Körpers. Mittels ihren charakteristischen wellenförmigen Schlägen der Wimpern bewegt sich die Art vorwärts, wobei sie sich typischerweise spiralförmig nach links dreht (Wichterman, 1986; Streble & Krauter, 2012). Mit ihrem Schwimmverhalten reagieren sie zudem auf Umwelteinflüsse, da diese sehr empfindlich wahrgenommen werden (Görtz et al., 1988). In Versuchen stellte Jennings (1906) fest, dass eine

gewisse minimale Konzentrationsschwelle an Schadstoffen überschritten werden muss, um eine Reaktion hervorzurufen. Weiter stellte er fest, dass es sich bei den Reaktionen um eine Vermeidungsreaktion handelt, welche eine Änderung der Schwimmrichtung bewirkt. Durch das Vermeiden ungünstiger Bedingungen sammeln sich mehr Individuen in günstigen Bereichen an, wodurch es zu einer Anhäufung von Lockstoffen kommt, welche weitere Individuen anlocken und daran hindern, in den ungünstigen Bereich einzudringen. Dies bewirkt, dass Paramecien dazu neigen sich in Medien mit optimalen Bedingungen anzureichern (Görtz et al., 1988; Jennings, 1906). Im Allgemeinen werden Paramecien von belüfteten Bereichen angezogen und von einer Vielzahl an ein- und zweiwertigen Kationensalzen abgestossen (Jennings, 1906). 1968 entdeckte Nakatani, dass die Vermeidungsreaktion auch in einer Änderung der Schwimmggeschwindigkeit resultiert. Somit konnte festgestellt werden, dass abstossende Stoffe in einer Verringerung und anziehende in einer Erhöhung der Schwimmggeschwindigkeit resultieren (Nakatani, 1968).

Über die Plasmamembrane regulieren Paramecien den Sauerstoffeintrag in ihren Körper und die Diffusion von Abfallstoffen aus dem Protoplasma. Hauptsächlich in Wasser gelöste organische Stoffe und Chemikalien können die Membran passieren. Weiter fungiert sie als osmotischer Regulator, da die osmotische Konzentration des Protoplasmas um einiges höher ist als die der Umgebung (Wichterman, 1986). Auf Änderungen der äusseren Osmolarität reagiert die Zelle mit abrupten Änderungen des Volumens an Flüssigkeit, welche über die Vakuolen ausgestossen wird. Dadurch wird verhindert, dass durch zu schnelles Anschwellen oder Schrumpfen der Zelle Risse in der Plasmamembrane entstehen. Generell nimmt die Menge an Flüssigkeit, welche über die kontraktilen Vakuolen ausgestossen wird, zu, sobald sich die Zelle in einer hypotonen Lösung befindet. In isotonen oder hypertonen Lösungen wird die Flüssigkeitsabgabe gestoppt (Iwamoto et al., 2005).

Durch die Plasmamembrane und ihren Zellmund nehmen Paramecien grosse Mengen an Wasser auf. In 15 bis 20 min können sie somit ihr eigenes Körpervolumen an Wasser umsetzen (Adolph, 1943; Wichterman, 1986). Über das durch den Zellmund strömende Wasser nehmen sie zudem ihre Nahrung auf, welche hauptsächlich aus Bakterien und einigen kleinen Protozoen besteht und in die dahinter liegenden Nahrungsvakuolen transportiert wird (Wichterman, 1986; Sathe, 2011; Streble & Krauter, 2012).

Die Vermehrung der Art geschieht mittels Zellteilung oder sexueller Fortpflanzung, bei letzterem verschmelzen zwei Zellkerne miteinander und zwei neue Tochterkerne entstehen. In Reinkulturen handelt es sich hierbei trotzdem um Inzuchttiere, da keine weitere DNA von aussen dazukommt. Zelllinien, welche sich rein asexuell fortpflanzen, sterben jedoch nach einer gewissen Anzahl an Zellteilungen ab während Linien mit vermehrter sexueller Fortpflanzung ewig fortbestehen können (Görtz et al., 1988). Versuche von 1933 berichten über Kulturen von *P. caudatum*, welche ohne

sexuelle Fortpflanzung über einen Zeitraum von 22 Jahren und fünf Monaten 8'704 Zellteilungen aufwiesen. Diese Resultate sind mit heutigen Erkenntnissen jedoch anzuzweifeln (Takagi & Yoshida, 1980). Die durch Zellteilung entstandenen Klone von *P. caudatum* weisen eine maximale Lebensdauer von 658 Spaltungen auf, wobei es vor ihrem Tod zu einer verringerten Spaltrate kommt (Takagi & Yoshida, 1980; Görtz et al., 1988). Dies zeigt, dass die Lebensdauer der Art nicht in Tagen, sondern in deren Spaltungen gemessen werden sollte (Takagi & Yoshida, 1980).

1.2 Einflussfaktoren auf das Wachstum

Das Wachstum von Paramecien wird durch verschiedene Faktoren wie die Nahrung, dem pH-Wert des Umgebungsmediums, der Temperatur, dem Lichteinfluss, den Abfallprodukten des Stoffwechsels und der Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidkonzentration im Medium beeinflusst. Bis auf die Nahrung gestaltet es sich jedoch als schwierig, einen Umweltfaktor unabhängig von den anderen Faktoren zu betrachten, da diese auf einen oder sogar mehrere andere Faktoren Einfluss haben, wodurch ein komplexes Geflecht von Einflüssen auf das Wachstum entsteht (Wichterman, 1986).

Eine Zunahme der Körpermasse ist durch die Aufnahme von Wasser oder Nahrung möglich. Den stärksten Zuwachs an Körpermasse erfahren die Paramecien in den ersten 90 min in einem neuen Medium. In dieser Zeit ist der Zuwachs unabhängig von der Nahrung und basiert rein auf der Aufnahme von Wasser. Der nachfolgende Zuwachs wird dann durch die Aufnahme an Futter beeinflusst. Populationen, welche in Heuaufgüssen gehalten wurden (hohe Bakterienanzahl), wiesen nach 24 h die ersten Zellteilungen auf und begannen sich zu vermehren. Populationen in reinem Leitungswasser (niedrige Bakterienanzahl) wiesen nach derselben Zeit noch dieselbe Anzahl an Individuen auf und es konnte keine Zellteilung festgestellt werden. Dadurch zeigte sich, dass die Paramecien ohne Futter zwar überleben können, für eine Vermehrung und Zuwachs der Population ist die Anwesenheit von Futter in Form von Bakterien jedoch unerlässlich (Estabrook, 1910).

Daraus resultierte, dass schon frühzeitig Bakterien als Nahrungsquelle für die Kultivierung von Paramecien verwendet wurden (Hargitt & Fray, 1917; Wichterman, 1986). Es konnte aufgezeigt werden, dass Paramecien mittels einer einzigen Art geeigneter Bakterien (z. B. *Klebsiella aerogenes*) gezüchtet werden können. Dadurch etablierten sich Züchtungen auf bakteriellen Nährböden, welche hauptsächlich aus getrocknetem Kopfsalat oder Cerophyl (Pulver bestehend aus Roggengras) bestanden (Wichterman, 1986). Als weitere Variante, neben dem in Wasser gelösten Cerophyl, können Bakterien auf einem Agar-Medium, bestehend aus Agar, Hefeextrakt, Glukose und Wasser, gezüchtet werden (Lilly & Klosek, 1961; Wichterman, 1986). Spätere Versuche mit *P. bursaria* zeigten, dass mit *Escherichia coli* IMG 1711 infiziertem Salat, ein intensiveres Wachstum als mit *Klebsiella pneumoniae* erreicht werden konnte. Der Stamm schaffte

es unabhängig von den Lichtverhältnissen eine hohe Anzahl an Paramecien zu produzieren. Zudem zeigte sich, dass sich *P. bursaria* von einem breiten Spektrum an Bakterien wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus* ernähren kann. Die besten Resultate wurden jedoch mit *Escherichia coli* IMG 1711 erzielt (Bator, 2010). Weitere Varianten für ein Futtermedium sind Heuaufgüsse, Milchkulturen, Kohlrübenschnitzel (Gattung: *Brassica*) oder Medien bestehend aus Weizenkörnern und Hefetabletten (Jennings, 1908; Streble & Krauter, 2012). Welches Medium auch verwendet wird, bakterienfressende Protozoen, wie die Paramecien, lassen sich am besten direkt im Medium züchten. (Streble & Krauter, 2012)

Das Wachstumsoptimum von Paramecien und spezifisch von *P. caudatum* wie auch von *P. aurelia* liegt bei einem pH-Wert von 7.0 (Lilly & Klosek, 1961; Wichterman, 1986). Kein Wachstum ist für beide Arten bei einem pH-Wert unter 5.5 und höher als 8.5 feststellbar (Wichterman, 1986).

Die Gattung reagiert sehr empfindlich auf Temperaturschwankungen und hat ihren optimalen Temperaturbereich zwischen 25 °C und 28 °C (Tawada & Oosawa, 1972). Die Idealtemperatur von Paramecien liegt bei ca. 26 °C, diese kann jedoch artspezifisch und sogar zwischen einzelnen Beständen leicht variieren. Für *P. caudatum* konnte eine Idealtemperatur von 25 °C ermittelt werden (Lilly & Klosek, 1961). *P. aurelia* dagegen weist eine Idealtemperatur von 27 °C auf (Soldo & Van Wagtendonk, 1969; Van Wagtendonk, 1974). Die Temperatur hat zudem direkten Einfluss auf die Geschwindigkeit der Wellenausbreitung der Wimpern und beeinflusst somit die Fortbewegungsgeschwindigkeit der Tierchen (Wichterman, 1986). Auf einen abrupten Temperaturwechsel reagieren sie mit einer kurzfristigen Erhöhung der Fortbewegungsgeschwindigkeit, welche dann exponentiell absinkt und sich, abhängig von der Temperatur, auf einem Niveau höher oder niedriger des Ausgangswertes stabilisiert. Ausgehend von der Idealtemperatur von 25 °C bedeute dies, dass Populationen bei 19 °C eine geringere Schwimgeschwindigkeit und Populationen bei 30 °C eine erhöhte Schwimgeschwindigkeit gegenüber der Idealtemperatur aufweisen (Tawada & Oosawa, 1972).

Durch das Vorkommen von Paramecien in natürlichen Gewässern lässt sich annehmen, dass das Licht einen Einfluss auf das Wachstum der Gattung hat (Wichterman, 1986; Sathe, 2011). Kultivierungsversuche bei vollständiger Dunkelheit mit *P. tetraurelia* und *P. busaria* zeigten ein bis zu 20 % höheres Wachstum auf als Kulturen, welche unter konstanter Beleuchtung kultiviert wurden (Thiele et al., 1980; Bator, 2010). Somit lässt sich darauf schliessen, dass während der Kultivierung auf eine Beleuchtung verzichtete und die Gattung bei vollständiger Dunkelheit in einem abgeschlossenen Behältnis (Reaktor) gezüchtet werden kann. Zudem scheint sich eine Beschattung, im Gegensatz zu einer konstanten Beleuchtung, eher positiv auf das Wachstum auszuwirken (Thiele et al., 1980; Bator, 2010).

Im Vergleich zu anderen *Ciliata* sind Paramecien besonders tolerant gegen niedrige Sauerstoffsättigungen im Umgebungsmedium. Während fünf bis sechs Tagen war es *P. caudatum* möglich in Abwesenheit von Sauerstoff in einer mit Stickstoff durchspülten Flasche zu überleben (Kitching, 1939). Sie werden von belüfteten Bereichen angezogen und neigen dazu, sich in unbelüfteten Kulturen an der Oberfläche (höhere Sauerstoffverfügbarkeit) anzusammeln (Jennings, 1906). Belüftete Kulturen wiesen zudem doppelt so hohe Populationsdichten auf als Kulturen ohne Belüftung. Diese Resultate können mit Druckluft wie auch mit Sauerstoff erreicht werden, es zeigte sich, dass bei beiden Varianten eine ausreichende Sauerstoffsättigung von ca. 100 % erreicht werden konnte. Für eine Kultivierung ist eine Belüftung mit Druckluft ausreichend und aus ökonomischer Sicht sinnvoller (Baier, 2020). Neben dem Sauerstoffeintrag hat die Belüftung einen Einfluss auf die Umwälzung des Mediums im Behälter. Die Gravitaxis von Paramecien und Sedimentation von partikulärem Material in statischen Kulturen wirkt sich negativ auf die Populationsdichte aus. Mit einer Umwälzung wird dem entgegengewirkt und es werden höhere Populationsdichten erreicht (Thiele et al., 1980; Wichterman, 1986). Es kann aber davon ausgegangen werden, dass die Umwälzung während der Belüftung nur ein positiver Nebeneffekt ist und die hohen Populationsdichten hauptsächlich durch den erhöhten Sauerstoffeintrag erreicht werden (Thiele et al., 1980).

2 Material und Methoden

Alle Experimente wurden ausschliesslich mit der Art *P. caudatum* (bezogen vom Institut für Zellbiologie, Universität Bern) durchgeführt. Stammkulturen dieser wurden im Labor bei $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ im Hefe-Weizen-Medium gehalten und zum Animpfen der Versuche verwendet. Alle vier bis sechs Wochen wurden Sie auf die Anwesenheit von *P. caudatum* überprüft und erneuert. Bei der Fütterung mit spezifischen Bakterien wurde ausschliesslich *Escherichia coli* C600 verwendet. Dabei handelt es sich um einen prototypischen K-12-Laborstamm, welcher sich seit seiner Isolierung 1954 in grossem Umfang für molekularbiologische und bakteriologische Studien eignet (Allué-Guardia et al., 2019).

2.1 Futtermedien

Das Hefe-Weizen-Medium wurde gemäss Westerfield (2000) produziert (Westerfield, 2000). Pro Liter Wasser wurden 50 Weizenkörner (bzw. 2.26 g) und 1.25 Hefetabletten (Eubiona, Baden-Baden, Deutschland) in die Gallone M1 gegeben. Die Weizenkörner (Mühle Spielberger, Brackenheim, Deutschland) wurden vorher in einer Schott Flasche mit deionisiertem Wasser für 5 min in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und mittels Wägelöffel in die Gallone überführt.

Für das *E. coli*-Medium wuchsen die Bakterien über Nacht in einem LB-Medium. Vorgängig wurden 7.5 g LB broth (Miller) (Merck KGaA, Deutschland) in einen 1000 ml Erlenmeyerkolben gegeben und

in 300 ml ultrafiltriertem Wasser aufgelöst. Der Kolben wurde dann bei 121 °C während 15 min Sterilisierzeit autoklaviert (Systec VX-95), mit einer Bakterienkultur angeimpft und über Nacht im Inkubator (Binder Kühlinkubator KT115) bei 37 °C gelassen. Zur gleichmässigen Verteilung der Bakterien stand der Kolben auf einem Schüttler (Geschwindigkeit: 260 U/min). Die *E. coli* Kultur wurde wöchentlich jeweils am Dienstag erneuert, sodass mittwochs (an den Versuchstagen eins und acht) jeweils eine neue Kultur für die Fütterung bereitstand.

2.2 Kultivierung von *P. caudatum* mittels Fütterung eines Hefe-Weizen-Mediums

2.2.1 Aufbau

Insgesamt wurden vier 19 L Wassergallonen (Höhe: 35 cm, Durchmesser: 25 cm) als Versuchsbehälter verwendet. Um Platz für Messgeräte und die Probeentnahme aus den Behältern zu schaffen, wurden die Gallonen am oberen Rand aufgeschnitten, wodurch sich deren Versuchsvolumen auf 15 L beschränkte (Abbildung 2). Drei Gallonen (P1–P3) dienten der Kultivierung von *P. caudatum* während in der vierten Gallone (M1) das Hefe-Weizen-Medium zur Fütterung produziert wurde (Abbildung 1). Um eine einheitliche und konstante Temperatur in allen Gallonen zu erreichen, wurden diese in ein Rundstrombecken (Volumen 1'700 L) gestellt. Da der Boden des Beckens kegelförmig nach unten ausläuft, wurde mittels einer Europalette eine waagrechte Arbeitsplattform geschaffen, worauf die Gallonen platziert wurden (Abbildung 1).

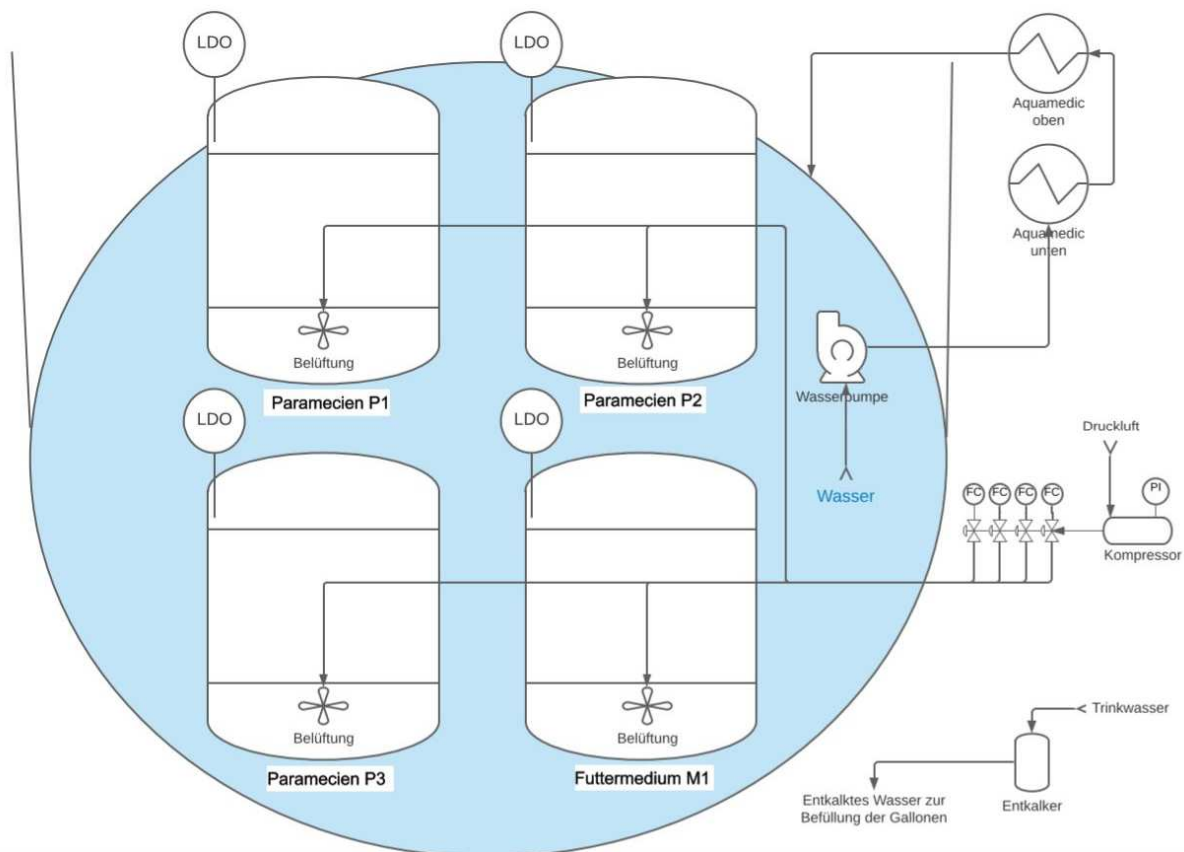


Abbildung 1: Vollständiger Aufbau der Versuchsanlage (eigene Darstellung)

Die Wassertemperatur im Rundstrombecken wurde mittels Durchlaufkühler mit einer Kühl-/Heizleistung von 5200 W (Titan Professional 6000, Aqua Medic, Deutschland) geregelt und auf einen Soll-Wert von $25\text{ °C} \pm 1.0\text{ °C}$ eingestellt. Über eine Strömungspumpe (DM-Vario 10000, Aqua Forte, Niederlande) wurde das Wasser zwischen dem Rundstrombecken und dem Durchlaufkühler im Kreislauf gehalten. Die Leistung der Strömungspumpe wurde auf 100 % eingestellt, wodurch eine ausreichende Zirkulation im Rundstrombecken und der empfohlene Durchfluss von 4'000 bis 12'000 L/h für den Durchlaufkühler erreicht wurde. Die Temperatur in den zu ca. 70 % im Wasser stehenden Versuchsgallonen wurden so mittels indirekten Wärmeaustausches auf einem Soll-Wert von 25 °C gehalten.



Abbildung 2: Rundstrombecken mit Arbeitsplattform und den darauf platzierten Wassergallonen. Die Gallonen sind mit Keramikausströmer, LDO-Sonden und einer Abdeckung ausgestattet.

Zusätzlich wurde jede Gallone mit einem Keramikausströmer (ECD100, Enviro Ceramic, Irland) zur Belüftung ausgestattet. Dadurch wurde eine möglichst feine Verteilung der Luftbläschen und eine hohe Sauerstoffsättigung erreicht. Die Ausströmer wurden über vier Durchflussregler (pro Ausströmer ein Regler) an einen Kompressor angeschlossen. Über das Druckreduzierventil des Kompressors wurde ein konstanter Druck von 2 bar eingestellt, wodurch ein konstanter Durchfluss von 0.2–1.0 L/h an den Durchflussreglern eingestellt und gehalten werden konnte. Im Durchschnitt lag der Durchfluss bei $0.8\text{ L/h} \pm 0.1\text{ L/h}$. Jede Gallone wurde weiter mit einer LDO-Prozesssonde ausgestattet, welche kontinuierlich (alle 5 min) die Temperatur [°C] (Anhang 1) und Sauerstoffsättigung [%] (Anhang 2) aufzeichnete. Die LDO-Sonde der Gallone P1 wies einen Übermittlungsfehler auf, wodurch über die gesamte Versuchsdauer nur alle 15 min Daten erhoben wurden.

2.2.2 Ablauf

Der Versuch wurde über eine Zeitspanne von 15 Tagen durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden alle Gallonen mit Virkon S (LANXES Deutschland GmbH, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:200, desinfiziert und gründlich mit Leitungswasser ausgespült (Stockton-Fiti & Moffitt, 2017). Die

genannte Verdünnung wird gemäss Packungsbeilage des Herstellers für Grunddesinfektionen empfohlen. Die Keramikausströmer wurden durch Eintauchen in die Desinfektionslösung desinfiziert und anschliessend mit Leitungswasser abgespült. Die LDO-Sonden wurden mit Ethanol 80 % zur Desinfektion behandelt. Danach wurden alle Systeme (Druckluft- und Heiz-/Kühlsystem) in Betrieb genommen und das Becken mit Wasser gefüllt. Als Erstes wurde in der Position M1 das Futtermedium angesetzt. Zwei Tage später wurden die Paramecien Gallonen P1 und P2 mit jeweils 13 L und P3 mit 12 L entkalktem Wasser befüllt. Über ein Küchensieb wurden die Gallonen dann mit je 1 L Stammkultur aus dem Labor angeimpft. Vor der Fütterung wurden in allen Gallonen die Umweltparameter pH-Wert, Temperatur, elektrische Leitfähigkeit, Sauerstoffsättigung und -konzentration gemessen. Danach wurden alle Gallonen, mittels Vollpipette, beprobt und das Probenmaterial in ein beschriftetes 15 ml Röhrchen überführt. Die Gallone P1 wurde mit 1 dl Futtermedium aus M1 gefüttert. P2 erhielt 4 dl Futter und P3 wurde mit 16 dl gefüttert. Nach der Fütterung wurde das Futtermedium M1 jeweils wieder mit 2.1 L entkalktem Wasser, 1 Hefetablette und 40 Weizenkörnern (bzw. 1.8 g) aufgefüllt. Diese Arbeiten wurden jeweils alle zwei Tage, montags, mittwochs und freitags durchgeführt. Ab dem achten Versuchstag wurde zudem vor der erneuten Fütterung zusätzlich die gleiche Menge Flüssigkeit, welche an Futter dazugegeben wurde, aus den Gallonen entfernt.

2.3 Kultivierung von *P. caudatum* mittels Fütterung von *Escherichia coli* C600

2.3.1 Aufbau

Der zweite Versuch wurde im Labor und nicht im Rundstrombecken durchgeführt. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Futtermengen (1 ml und 5 ml Futtermedium) verglichen, beide wurden jeweils dreimal repliziert, was eine Gesamtzahl von sechs Kulturen ergab. Die Belüftung wurde mittels Aquarium Luftpumpe APS 400 mit einer Leistung von 400 L/h (TetraTec Instruments GmbH, Deutschland) und Ausströmersteinen AS35 Ø 23 mm (TetraTec Instruments GmbH, Deutschland) sichergestellt (Abbildung 3). Durch die konstante Regelung der Raumtemperatur im Labor auf $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ war kein zusätzliches Heiz-/Kühlsystem zur Temperaturregelung notwendig.

2.3.2 Ablauf

Die Kolben wurden jeweils mit 500 ml deionisiertem Wasser gefüllt und mit 10 ml Paramecien aus einer Stammkultur, angeimpft (160 Ind./ml). Am dritten Versuchstag wurde aufgrund sehr geringer bis keiner Paramecienanzahl alle Kolben erneut mit 10 ml der gleichen Stammkultur angeimpft (160 Ind./ml). Die Dauer des Versuches wie auch die Beprobungsintervalle waren identisch wie bei der Kultivierung von *P. caudatum* mittels Fütterung eines Hefe-Weizen-Mediums. Zur Auszählung wurde zweimal je 1 ml Probe aus den



Abbildung 3: Zweiter Versuchsaufbau mit sechs 500 ml Erlenmeyerkolben und jeweiliger Belüftung. 1 ml *E. coli*-Medium (oben), 2 ml *E. coli*-Medium (unten).

Kolben entnommen und in ein Röhrchen überführt. Vor der Fütterung wurden die Umweltparameter pH-Wert, Temperatur, elektrische Leitfähigkeit, Sauerstoffsättigung und -konzentration aufgenommen. Danach wurden jeweils drei Kolben mit 1 ml *E. coli*-Medium und drei Kolben mit 5 ml *E. coli*-Medium gefüttert.

2.4 Analytik und Laborarbeiten

2.4.1 Ausplattieren der Bakterien

Zur Kontrolle der Bakterienabundanz im Hefe-Weizen-Medium wurde jeweils vor der Fütterung eine 15 ml Probe entnommen. Das *E.coli*-Medium wurde einmal nach dem Inkubieren der Bakterien auf dem LB-Medium beprobt. Zu Beginn wurde im Labor eine Verdünnungsreihe erstellt (Abbildung 4). Für die negative Kontrolle wurde steriles Wasser verwendet, wobei es sich um Trinkwasser handelt, welches über einen Filter (0.22 µm) filtriert wurde. Aus der Verdünnungsreihe wurden jeweils pro Verdünnung 5 µl auf eine Agarplatte pipettiert (Anhang 5E). Bis zur Auszählung wuchsen die Bakterien für 48h in einem dunklen Raum ohne Lichteinfall. Bakterienproben, welche am Freitag ausplattiert wurden, blieben über das Wochenende bei 4 °C im Kühlschrank und wurden am Montag wieder herausgenommen. Dadurch konnte das Bakterienwachstum über das Wochenende gestoppt werden, und die Kulturen konnten ab Montag für 48h in einem dunklen Raum weiterwachsen und am Mittwoch ausgezählt werden.

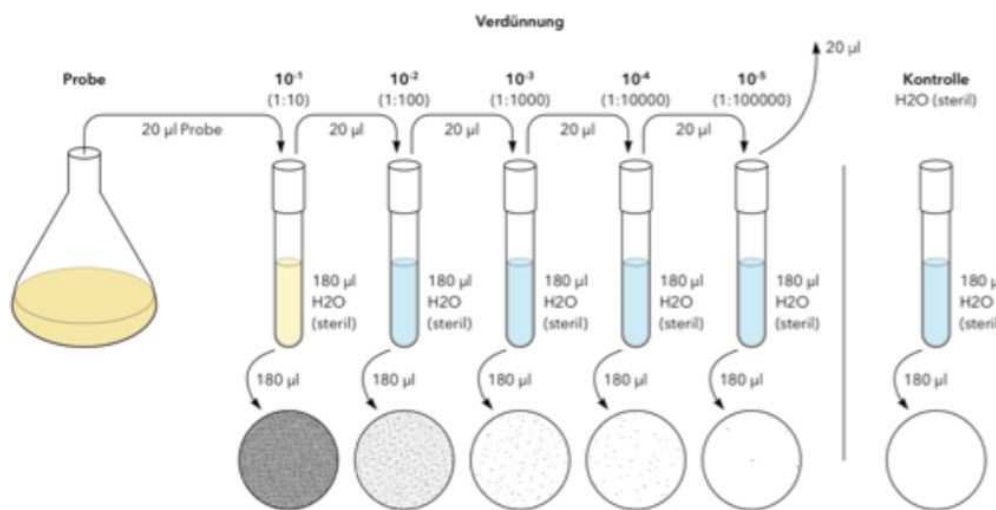


Abbildung 4: Herstellung der Verdünnungsreihe zur Kontrolle der Bakterienabundanz (Baier, 2020)

Nach 48 h wurden die einzelnen Agarplatten visuell ausgezählt, wodurch sich die Anzahl an koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Platte ergab. Daraus wurde dann die Anzahl an KBE/ml errechnet (Formel 1).

$$\text{Anzahl Einheiten pro ml} = \frac{\text{gezählte Einheiten}}{\text{Volumen [ml] auf der Agarplatte}} \times \text{Faktor der Verdünnung}$$

Formel 1: Formel zur Bestimmung koloniebildender Einheiten (KBE/ml)

2.4.2 Zählen der Pantoffeltierchen

Die Anzahl der Paramecien pro Milliliter wurde im Labor unter einer Stereolupe (Vergrößerung 1.25) ermittelt. Dafür wurden die Proben durch mehrmaliges Schwenken des Röhrchens durchmischt und jeweils 1 ml der Probe in die Auszählkammer (Volumen: 9ml) gegeben. Da die Populationsdichte eher im kleineren Bereich war, war keine vorgängige Verdünnung der Probe notwendig und die Individuenzahl pro ml konnte direkt ermittelt werden.

2.4.3 Messungen mit der Multisonde

Die Umweltparameter pH-Wert, Temperatur, elektrische Leitfähigkeit, Sauerstoffsättigung und -konzentration wurden jeweils vor der Fütterung mittels Multisonde (HQ40d) aufgenommen. Um Kreuzkontaminationen unter den einzelnen Kulturen zu vermeiden, wurden zwei separate Sonden für die Paramecienkulturen und das Futtermedium verwendet. Zwischen den Messungen der einzelnen Paramecienkulturen wurde die Sonde mit deionisiertem Wasser abgewaschen. Die Sonden für das Futtermedium wurden vorgängig zur Desinfektion für 5 min in Ethanol 80 % gestellt und vor der Messung mit deionisiertem Wasser abgewaschen.

3 Resultate

Durch Zugabe von extern produziertem Futter war es möglich, *P. caudatum* zu kultivieren. Eine Kultivierung war mittels Hefe-Weizen-Medium wie auch mit dem *E. coli*-Medium erfolgreich und ein Zuwachs der Population konnte ermittelt werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine Kultivierung mit *Escherichia coli* C600 als einzige Nahrungsquelle möglich ist. Ein Einfluss einer zeitgleichen Entnahme von Flüssigkeit aus den Gallonen auf das Wachstum der Paramecien konnte nicht ermittelt werden und eine Stabilisierung der Wachstumskurve wurde damit nicht erreicht.

3.1 Kultivierung von *P. caudatum* mittels Fütterung eines Hefe-Weizen-Mediums

Eine erhöhte Fütterung mit dem Hefe-Weizen-Medium resultierte in einer höheren Populationsdichte, somit wurden bei der grössten Fütterungsmenge von 16 dl die höchsten Populationsdichten von max.47 Ind./ml erreicht. Je grösser die Fütterungsmenge war, desto höher war auch die Bakterienanzahl, welche verfüttert wurde, wodurch den Paramecien pro Fütterung mehr Futter zur Verfügung stand (Tabelle 1). In keiner der Kulturen konnte ein kontinuierliches Wachstum festgestellt werden. Die Populationen erreichten, wie schon bei früheren Studien (Cotter, 2018; Baier, 2020), ab dem sechsten Versuchstag ihr Maximum, brachen danach jedoch wieder ein und konnten nicht auf ihrem höchsten Niveau gehalten werden (Abbildung 5)

Tabelle 1: Anzahl an Bakterien, welche an den jeweiligen Versuchstagen in der Fütterungsmenge enthalten waren und an die Paramecienkulturen P1 bis P3 verfüttert wurden.

Versuchstag	KBE in 1 dl Gallone P1	KBE in 4 dl Gallone P2	KBE in 16 dl Gallone P3
1	$5.22 \cdot 10^9$	$2.09 \cdot 10^{10}$	$8.36 \cdot 10^{10}$
3	$1.39 \cdot 10^{10}$	$5.56 \cdot 10^{10}$	$2.22 \cdot 10^{11}$
8	$2.80 \cdot 10^6$	$1.12 \cdot 10^7$	$4.48 \cdot 10^7$
10	$2.20 \cdot 10^7$	$8.80 \cdot 10^7$	$3.52 \cdot 10^8$
13	$2.60 \cdot 10^7$	$1.04 \cdot 10^8$	$4.16 \cdot 10^8$

Die Anzahl an Bakterien im Futtermedium zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die Wachstumskurve von *P. caudatum*. Wie die Populationsdichte der Paramecien, brach sie zum achten Versuchstag hin ein und ein Rückgang der Bakterienanzahl wurde ermittelt (Abbildung 6). Die Populationsdichte korrelierte somit mit der Bakterienanzahl des Futtermediums, so wurden vor dem Erreichen der höchsten Populationsdichte auch die höchsten Werte in der Bakterienanzahl gemessen (Abbildung 6). Für den sechsten Versuchstag konnte aufgrund eines Fehlers im Labor keine Bakterienanzahl bestimmt werden.

Der Verlust an Bakterien und somit an Futter, welches den Paramecien pro Fütterung zur Verfügung stand, ist für den Rückgang der Populationsdichte verantwortlich. Je mehr Futter den Paramecien zur Verfügung stand, desto grösser waren die Populationsdichten. Die Stabilisierung der Bakterienanzahl und der Populationsdichte in den letzten vier Versuchstagen bestätigt den Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit von Futter (Bakterien) und der Populationsdichte (Abbildung 5 und 6). Eine externe Produktion des Futtermediums ist somit möglich, jedoch noch zu ineffizient und instabil, um konstante Populationsdichten zu erreichen.

Der Rückgang der Bakterienzahl im Futtermedium lässt sich auf die Anwesenheit weiterer bakterienfressender Einzeller zurückführen. Unter dem Mikroskop konnte eine hohe Anzahl an verschiedenen Wimperntierchen im Futtermedium festgestellt werden. Über die Fütterung gelangten diese Tierchen in die Paramecien Gallonen und konnten, in geringeren Mengen, auch dort nachgewiesen werden, wo sie in direkter Konkurrenz um das Futter mit den Paramecien standen. Das verringerte Vorkommen der weiteren Wimperntierchen in den Paramecienkulturen lässt sich auf die dortige geringe Bakterienanzahl und den Konkurrenzdruck der grösseren Pantoffeltierchen zurückführen. Eine Kontamination von *P. caudatum* im Futtermedium konnte ausgeschlossen werden, da die Art bei den Kontrollen nicht nachgewiesen werden konnte. Der Klassifizierung der Einzeller im Futtermedium wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter nachgegangen.

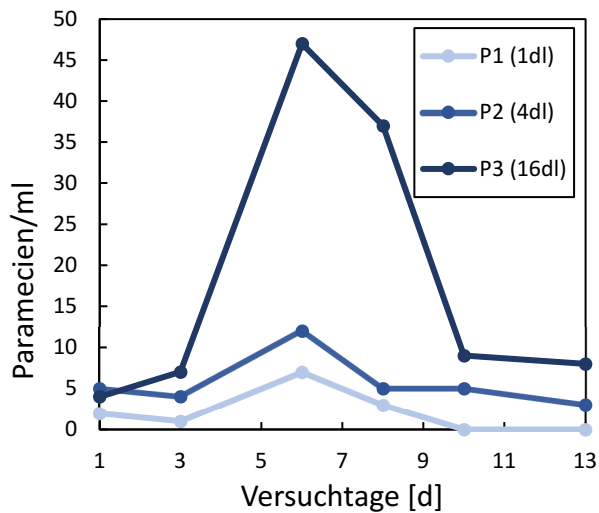


Abbildung 5: Anzahl der Paramecien in den Paramecien-Gallonen P1–P3 pro ml über den Versuchszeitraum. P1 (blau), P2 (orange), P3 (grau).

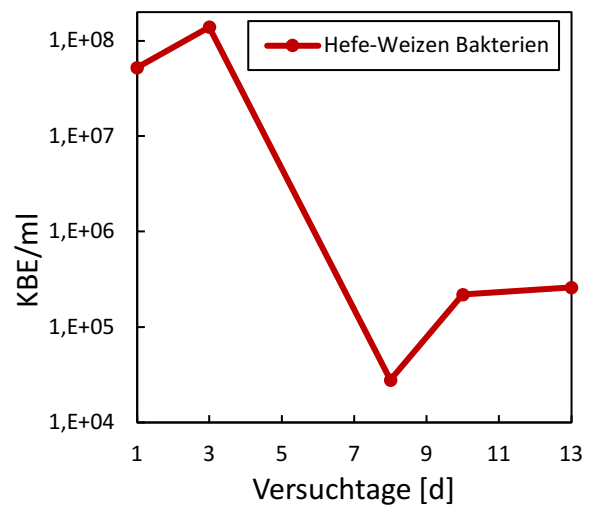


Abbildung 6: Koloniebildende Einheiten (KBE) pro ml des Futtermediums M1 über den Versuchszeitraum

Der pH-Wert bewegte sich stabil in einem Bereich von 7.8 bis 8.7 mit einem Mittelwert von 8.52 und stieg über die gesamte Versuchsdauer leicht an. Das Futtermedium wies dabei konstant geringere Werte auf als die Paramecienkulturen, welche untereinander nur sehr geringe und vernachlässigbare Unterschiede aufwiesen (Abbildung 7A). Mit einem Mittelwert von 8.52 lag der pH-Wert an der oberen Grenze des Bereiches, welcher für *P. caudatum* optimal wäre (pH 5.5 bis 8.5). Somit kann angenommen werden, dass die erhöhten Werte einen negativen Einfluss auf das Wachstum hatten. Dies wurde im Versuch jedoch nicht genauer bestätigt, da in allen Gallonen die gleichen Bedingungen herrschten und somit keine Vergleichswerte vorliegen. Der ansteigende pH-Wert lässt sich auf die konstante Belüftung zurückführen. Durch die erzeugten Turbulenzen wird mehr CO₂ ausgegast wodurch sich der Anteil an Kohlensäure im Wasser verringert, was dazu führt das der pH-Wert ansteigt (Kirby et al., 2009).

Bei der elektrischen Leitfähigkeit (EC) konnten grosse Differenzen zwischen den einzelnen Gallonen beobachtet werden (Abbildung 7B). Sie ist stark von der Menge an Futtermedium in den Gallonen und der Bakterienaktivität abhängig. Durch die Zersetzung der Weizenkörner und Hefetabletten werden mehr Mineralien ins Wasser abgegeben, wodurch sich die Anzahl an gelösten Stoffen im Wasser erhöhte, was einen Anstieg der elektrischen Leitfähigkeit verursachte. Somit wies das Futtermedium die höchsten Werte auf, wobei die Paramecium Kultur mit der geringsten Fütterung die geringste elektrische Leitfähigkeit aufwies. Durch die regelmässige Zugabe an Futtermedium über die Versuchsdauer stieg der Wert in den Paramecienkulturen stetig an. Auch hierbei sind die Unterschiede in der Fütterungsmenge erkennbar. Je grösser die Fütterungsmenge war, umso stärker stieg die elektrische Leitfähigkeit an. Die zugegebene Futtermenge beeinflusst somit massgeblich die elektrische Leitfähigkeit.

Die Sauerstoffkonzentration der Paramecien-Gallonen blieb über den gesamten Zeitraum stabil und wies einen Mittelwert von 8.41 mg/L auf (Abbildung 7C). Im Futtermedium war die Sauerstoffkonzentration zu Beginn des Versuches höher als die der Paramecien-Gallonen, fiel dann jedoch ab und pendelte sich auf einen Mittelwert von 7.1 mg/L ein. Die sinkende Sauerstoffkonzentration lässt sich auf einen Temperaturanstieg in den ersten drei Tagen zurückführen. Die Sauerstoffsättigung der Paramecienkulturen lag im Mittelwert bei 101 %, die des Futtermediums bei 97 % (Abbildung 7D). Insgesamt lag die Sauerstoffsättigung bei den Paramecienkulturen in einem Bereich von 93 bis 107 % (Anhang 2). Somit wurde über den gesamten Versuchszeitraum eine stabile und ausreichende Sauerstoffsättigung erreicht. Ein Mangel an Sauerstoff und eine damit verbundene Hemmung des Wachstums kann ausgeschlossen werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die hohe Sauerstoffsättigung das Wachstum der Kultur begünstigt. Die niedrigen Sauerstoffkonzentrationen und -sättigungen im Futtermedium lassen sich auf erhöhte Bakterienaktivität zurückführen. Ein Zusammenhang zwischen der Sauerstoffkonzentration/-sättigung und der Menge an gefütterten Bakterien zwischen den einzelnen Paramecien-Gallonen konnte nicht festgestellt werden. Die Differenzen in den Messwerten lassen sich eher auf Druckverluste im Druckluftsystem der Keramikausströmer zurückführen. Durch eine serielle Schaltung dieser und unterschiedlich langer Verbindungsschläuche ist davon auszugehen, dass kein konstanter Druck von 2 bar an jedem Ausströmer herrschte. Dies konnte visuell anhand der Bläschenform und -stärke bestätigt werden.

Im Mittelwert konnte die Temperatur über den gesamten Zeitraum auf einem Wert von 23.75 °C gehalten werden. Aufgrund der saisonal bedingten fallenden Aussentemperaturen fiel sie stetig bis auf einen Wert von 23 °C ab (Abbildung 7E) (Anhang 1). Diese Schwankungen liegen jedoch im akzeptablen Bereich und es kann davon ausgegangen werden, dass die Temperatur nicht für den Rückgang der Populationsdichten verantwortlich ist und günstige Bedingungen für die Kultivierung erreicht wurden.

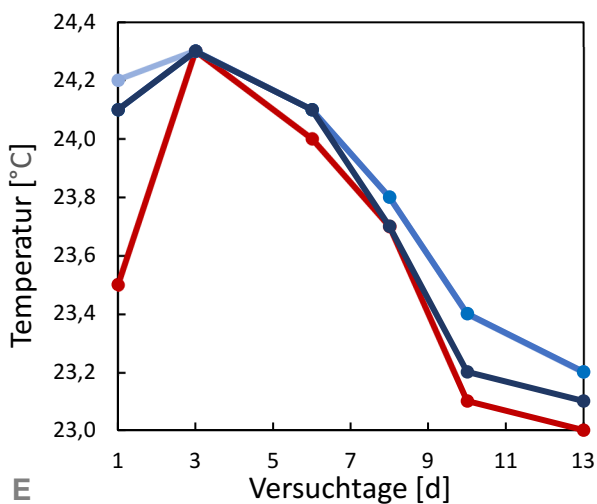
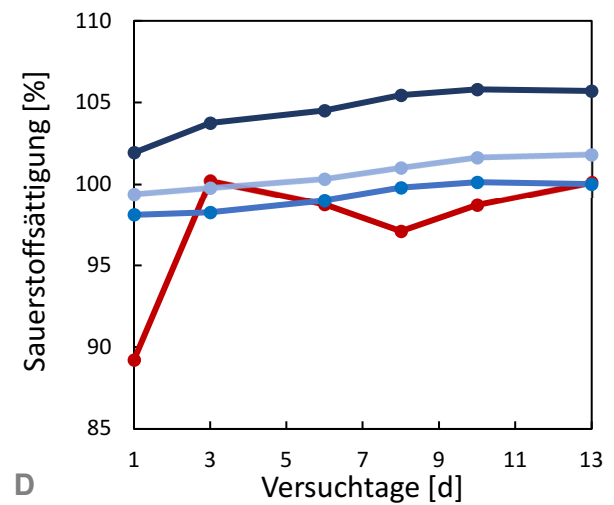
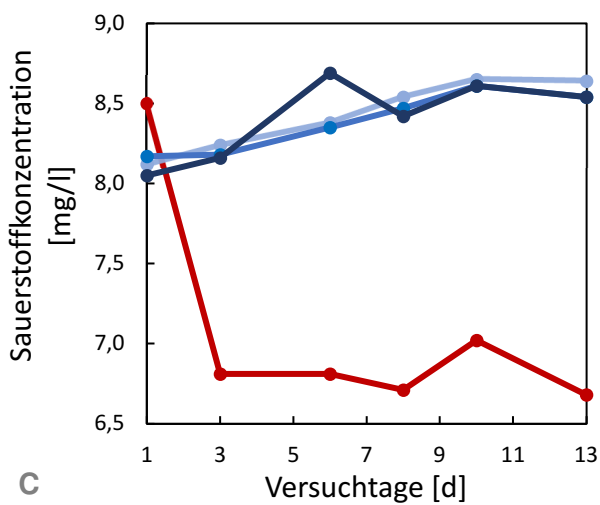
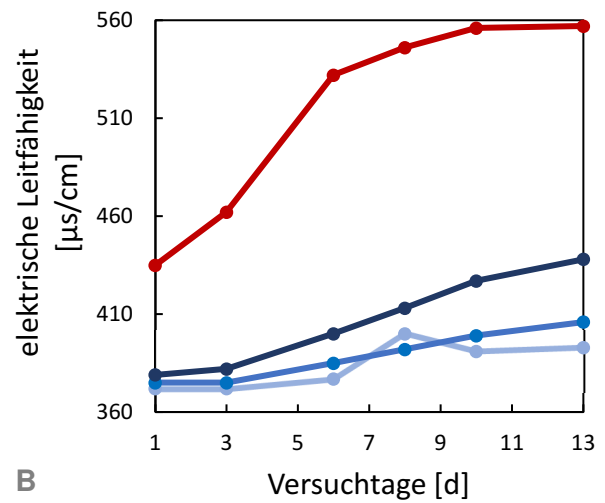
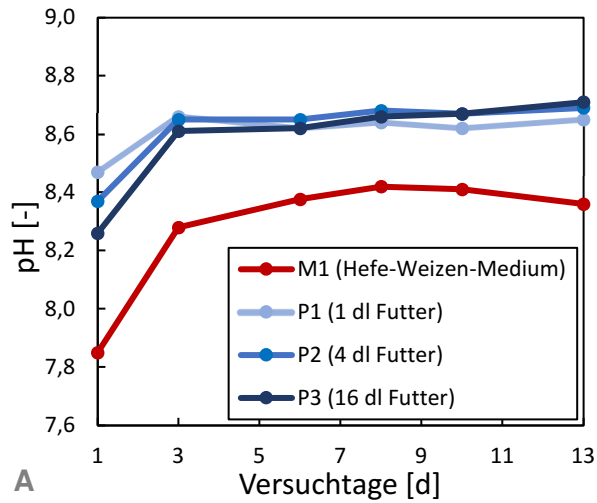


Abbildung 7: Messwerte für pH-Wert (A), elektrische Leitfähigkeit (B), Sauerstoffkonzentration (C), Sauerstoffsättigung (D) und Temperatur (E) über den ganzen Versuchszeitraum von 13 Tagen.

3.2 Kultivierung von *P. caudatum* mittels Fütterung von *Escherichia coli* C600

Ein Zuwachs der Population konnte mit einer Fütterung von 1 ml und 5 ml *E. coli*-Medium festgestellt werden (Abbildung 8). Die Fütterung mit 1 ml erzielte die höchsten Populationsdichten (Abbildung

8A). Weiter waren die Kulturen bis zum Ende des Experimentes am Leben. Zwischen den drei Replikaten der Reihe wurden jedoch sehr unterschiedliche Dichten von 8 Ind./ml bis 140 Ind./ml erreicht (Abbildung 8A). Die Fütterung mit 5 ml *E. coli*-Medium ergab nur sehr geringe Populationsdichten, welche im Vergleich um das 70-fache kleiner waren als bei einer Fütterung mit 1 ml *E. coli*-Medium. Zudem überlebten die Kulturen nicht bis zum Ende des Experimentes und wiesen eine um fünf Tage kürzere Lebensdauer auf (Abbildung 8B). Zwischen den einzelnen Replikaten konnten jedoch geringe Unterschiede und eine kleine Standardabweichung festgestellt werden. Die Kontrolle der Bakterienanzahl der *E. coli*-Medium ergab $3.6 \cdot 10^8$ KBE/ml, was für die 5 ml Fütterung $1.8 \cdot 10^9$ KBE ergab. Da nach der Inkubation kein weiteres Bakterium Wachstum im Medium stattgefunden hat, blieb die Anzahl an KBE/ml für jede Fütterung gleich.

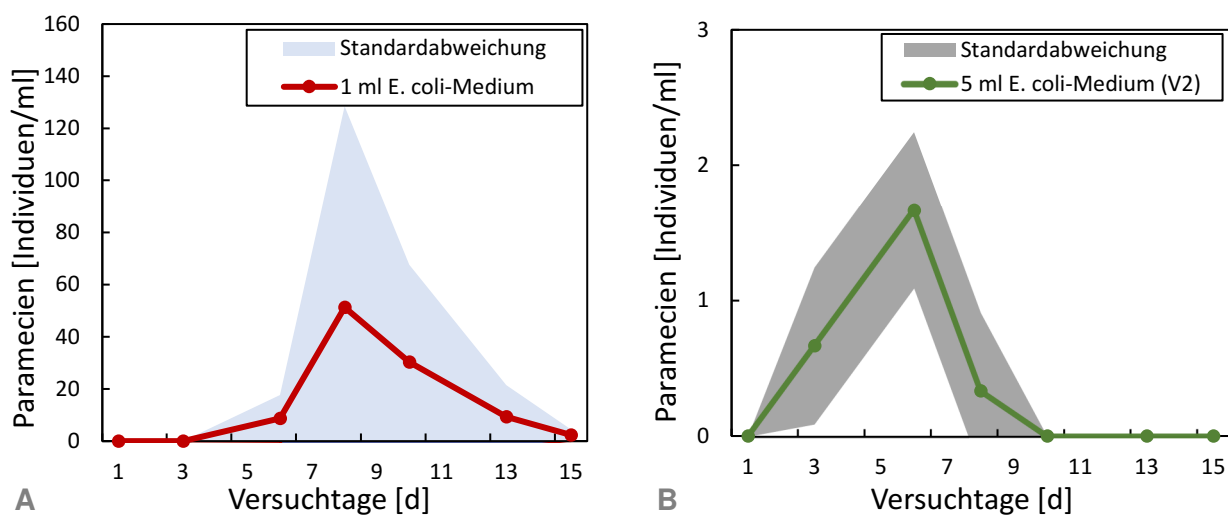


Abbildung 8: Mittelwert (Linie) und Standardabweichung (Fläche) der Populationsdichten der drei Replikate für eine Fütterung mit 1 ml *E. coli*-Medium (A) und 5 ml *E. coli*-Medium (B).

Es kann daher gesagt werden, dass eine Fütterungsmenge von 5 ml *E. coli*-Medium bzw. $1.8 \cdot 10^9$ KBE das Wachstum der Paramecien negativ beeinflusst und hemmt. Zudem starben die Populationen früher ab und wiesen eine kürzere Lebensdauer auf. Für eine Fütterung mittels *E. coli*-Medium erwies sich ein Volumen von 1 ml bzw. $3.6 \cdot 10^8$ KBE als die effizientere Variante. Die Populationen wiesen höhere Populationsdichten und eine höhere Lebensdauer auf. Aufgrund der unterschiedlichen Populationsdichten der einzelnen Replikate kann gesagt werden, dass eine Kultivierung von *P. caudatum* mit *E. coli* eine sehr un stabile Variante der Kultivierung ist (Abbildung 8).

Die aufgenommenen Umweltparameter wurden jeweils im Mittelwert über die drei Replikate dargestellt (Abbildung 9). Der pH-Wert stieg wie beim Hefe-Weizen-Medium konstant bis auf einen Wert von 8.5 an. Dies kann hauptsächlich auf die Belüftung mit Umgebungsluft zurückgeführt werden. Kulturen, welche mit 1 ml *E. coli*-Medium gefüttert wurden, wiesen einen konstant niedrigeren pH-Wert auf als Kulturen, mit 5 ml *E. coli*-Medium (Abbildung 9A). Dies lässt sich auf eine schwächere Belüftung, durch Druckverluste in den Leitungen und höhere Aktivität der Paramecien in den

Kulturen zurückführen. Der Einbruch des pH-Wertes am achten Tag in den Kulturen mit 1 ml *E.coli*-Medium lässt sich auf einen Messfehler oder kurzfristige Änderungen in der Belüftung zurückführen, da sich der Verlauf des Wertes ab dem elften Tag wieder normalisierte.

Aufgrund der im Labor herrschenden konstanten Bedingungen wurde über den gesamten Versuchszeitraum eine Temperatur von $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ erreicht (Abbildung 9B). Kleinere Temperaturschwankungen ergaben sich, da immer wieder verdunstetes Wasser aus den Kulturen mit frischem deionisiertem Wasser aufgefüllt wurde. Die Temperatur lag etwa 3 °C unter der Idealtemperatur (25 °C) von *P. caudatum*, wodurch ein leicht langsames Wachstum der Population zu erwarten wäre. Dies konnte nicht bestätigt werden und ein direkter Einfluss der Temperatur auf das Absterben der Population wurde nicht aufgezeigt. Es kann aber davon ausgegangen werden dass sich die Temperatur in einem Bereich bewegte, welcher von den Paramecien bevorzugt wird.

Über den gesamten Versuchszeitraum wurde in den Paramecienkulturen eine konstante Sauerstoffkonzentration von $7.75\text{ mg/L} \pm 0.5\text{ mg/L}$ erreicht (Abbildung 9C). Die Sauerstoffsättigung blieb während des Versuches stabil und lag zwischen 93 % und 98 %. Geringere Schwankungen in der Sättigung sind auf Druckverluste im Belüftungssystem zurückzuführen, wodurch einige Replikate stärker oder schwächer belüftet wurden als andere. Die Werte liegen jedoch im akzeptablen Bereich und ein negativer Einfluss auf die Kulturen durch die leicht unterschiedliche Belüftung wurde nicht ermittelt. Über den gesamten Versuchszeitraum konnte eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Kulturen erreicht werden. Eine Hemmung des Wachstums durch Sauerstoffmangel kann daher ausgeschlossen werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die hohe Sauerstoffsättigung das Wachstum der Kultur begünstigt hat (Abbildung 9D).

Durch die stetige Fütterung konnte auch ein stetiger Anstieg der elektrischen Leitfähigkeit (EC) beobachtet werden. Bei der Fütterung mit 5 ml an *E. coli*-Medium konnten somit weitaus höhere EC-Werte ($1954\text{ }\mu\text{s/cm}$) ermittelt werden als bei der Fütterung mit 1 ml Medium ($577\text{ }\mu\text{s/cm}$) (Abbildung 9E). Die von Anfang an erhöhte EC weist zudem auf ein geringeres Wachstum und somit geringe Populationsdichten bei einer Fütterung von 5 ml *E. coli*-Medium hin. Die zu kleinen Populationen konnten das Futter nicht verwehren, wodurch es sich im Umgebungsmedium anreicherte. Bei einer Fütterung mit 1 ml *E. coli*-Medium wurden höhere Populationsdichten wie auch geringere EC-Werte erreicht. Die dort erreichten Werte gleichen zudem den erlangten Werten aus der Fütterung mit dem Hefe-Weizen-Medium. Weiter konnten bei einer Fütterung mit dem Hefe-Weizen-Medium trotz unterschiedlicher Populationsdichten über alle Gallonen ähnliche Werte in der EC ermittelt werden. Dies lässt darauf schliessen, dass die erhöhte Fütterung von 5 ml *E.coli*-Medium und die damit verbundene hohe Bakterienanzahl und EC einen negativen Einfluss auf das Wachstum hatten und dieses möglicherweise sogar hemmten.

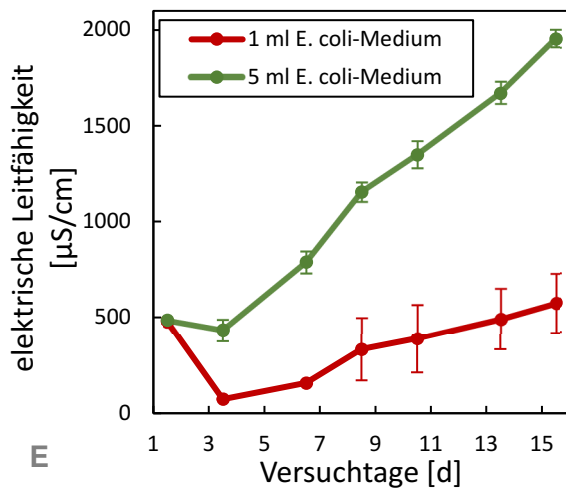
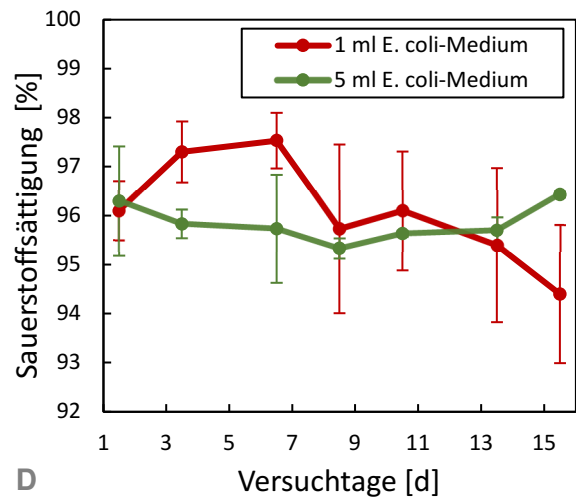
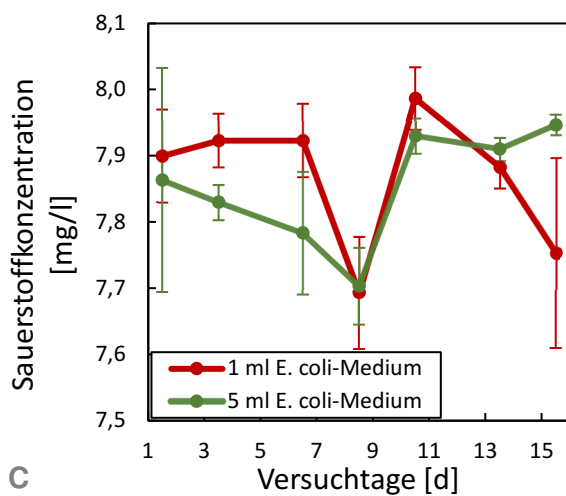
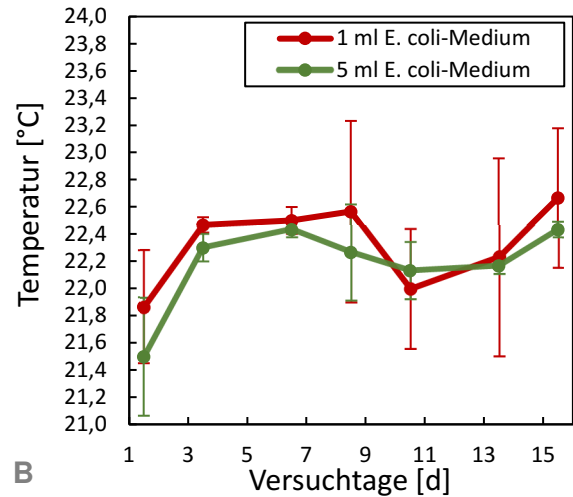
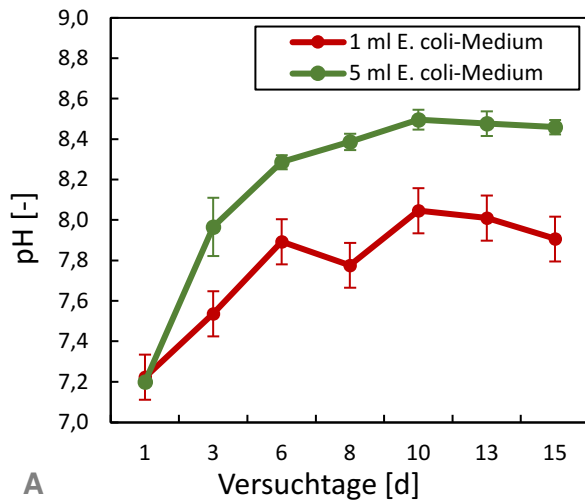


Abbildung 9: Mittelwerte inklusive des pH-Wertes (A), Temperatur (B), Sauerstoffkonzentration (C), Sauerstoffsättigung (D) und elektrischen Leitfähigkeit (E) für die Fütterungen mit 1 ml E. coli-Medium (rot) und 5 ml E.coli-Medium (grün).

Bei den Umweltparametern kann angenommen werden das sich die Temperatur, Sauerstoffsättigung wie auch -konzentration in einem Bereich bewegten, welcher von den Paramecien bevorzugt wird. Die Werte des pH-Wertes und der elektrischen Leitfähigkeit dagegen schienen sich negativ auf das Wachstum auszuwirken. Eine zu hohe Fütterungsmenge zeigt sich zudem an einem starken Anstieg der EC über den Versuchszeitraum. Weiter kann davon

ausgegangen werden das eine Bakterienanzahl von $1.8 \cdot 10^9$ KBE das Wachstum der Paramecien von Anfang an unterdrückte, wodurch die Population sich nicht ausreichend entwickeln konnte. Ein Lösungsansatz dagegen wäre die stufenweise Erhöhung der Fütterungsmenge mit dem Zuwachs der Population. Zudem ist eine Kultivierung mittels *E. coli* sehr unbeständig und die erreichten Populationsdichten bewegten sich eher im tieferen Bereich.

4 Diskussion

Der Versuchsaufbau von Baier (2020) zur Kultivierung von *P. caudatum* mittels Hefe-Weizen-Medium konnte repliziert werden. Unterschieden haben sich die Arbeiten hauptsächlich darin, dass die Paramecien mit einer definierten Menge an Hefe-Weizen-Medium gefüttert wurden und nicht direkt im Medium kultiviert wurden. Weiter wurde zusätzlich zur Paramecienanzahl in den Paramecienkulturen die Anzahl an Bakterien im Futtermedium bestimmt. Bei der Kultivierung wurde ein ähnliches Muster im Verlauf der Populationsentwicklung erreicht und die Kulturen erreichten ihr maximales Populationswachstum ca. ab dem sechsten Versuchstag (Cotter, 2018; Baier, 2020). Daher kann gesagt werden, das, unabhängig von der erreichten Populationsdichte, die höchsten Populationsdichten von *P. caudatum* im Hefe-Weizen-Medium um den sechsten Tag nach ansetzen der Kultur erreicht werden (Cotter, 2018; Baier, 2020). Gegenüber Kulturen, welche direkt im Hefe-Weizen-Medium gezüchtet wurden und Populationsdichten von 2070 Ind./ml erreichten, wurden mittels Fütterung desselben Mediums erheblich geringere Populationsdichten von 47 Ind./ml erreicht (Baier, 2020). Bei Kultivierungen in kleineren Volumina direkt im Hefe-Weizen-Medium wurden sogar Populationsdichten von >5000 Ind./ml erreicht (Cotter, 2018). Daraus kann geschlossen werden, dass eine Kultivierung im Hefe-Weizen-Medium effizienter ist als eine Fütterung mit demselben Medium. Die Fütterung erwies sich zwar als möglich, aber ineffizient. Die Menge an Futter und die darin enthaltene Bakterienanzahl war zu gering, um hohe Populationsdichten zu erreichen. Zudem konnte mittels Fütterung keine kontinuierliche Kultivierung der Art ermöglicht werden. Nach Erreichen ihrer höchsten Populationsdichten brachen sie wieder ein und starben ab.

Im Vergleich zur Bakterienanzahl konnte festgestellt werden, dass diese mit der Paramecien Anzahl korreliert und über den Versuchszeitraum nach einer ersten Zunahme stark zurückging. Daher ist anzunehmen, dass die Populationen aufgrund eines Mangels an Futter einbrachen. Am achten Versuchstag wurde ein Rückgang der Population wie auch die geringste Bakterienanzahl gemessen. Durch die Anwesenheit von weiteren bakterienfressenden Einzellern, hauptsächlich weitere Arten von Wimperntierchen, im Futtermedium, lässt sich darauf schliessen, dass diese für den Rückgang der Bakterienzahl verantwortlich sind. Durch die Reduktion der Bakterien standen diese Organismen in direkter Konkurrenz mit den Paramecien und gelangten über die Fütterung auch in die Paramecienkulturen. Dort schien deren Abundanz jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen, sie wurden jedoch über den gesamten Versuchszeitraum in allen Kulturen weiter nachgewiesen. Das

geringere Vorkommen der weiteren Wimpertierchen in den Paramecienkulturen lässt sich auf die dort geringere Bakterienanzahl und den höheren Konkurrenzdruck durch die Paramecien zurückführen.

Bei den Umweltparametern Temperatur, Sauerstoffsättigung und -konzentration wurden optimale Bedingungen für die Kultivierung von *P. caudatum* erreicht und es ist davon auszugehen, dass diese das Wachstum positiv beeinflusst haben. Der pH stieg über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich an und lag im Mittelwert bei 8.52, welcher über dem Bereich von 5.5 bis 8.5 liegt, in welchem sich Paramecien kultivieren lassen. Es ist daher davon auszugehen, dass die Druckluftbelüftung, welche für eine ausreichende Sauerstoffsättigung notwendig ist, den pH-Wert ansteigen lässt, wodurch das Medium immer ungünstiger für die Kultivierung von Paramecien wurde. Kulturen ohne Belüftung oder mit Belüftung mittels reinem Sauerstoff wiesen pH-Werte von 6.1 bis 7.5 auf, wobei mit Druckluft belüftete Kulturen eine pH von 7.7 bis 8.7 aufwiesen (Cotter, 2018; Baier, 2020). Durch die Belüftung und die dadurch erzeugten Turbulenzen wird mehr Kohlendioxid (CO₂) aus dem Wasser ausgegast, wodurch dieses weniger Reaktionen mit den Wasserbestandteilen eingehen kann und weniger Kohlensäure (H₂CO₃) produziert wird. Durch den geringen Anteil an Kohlensäure werden bei ihrer Dissoziation zu Carbonationen (CO₃²⁻) weniger H⁺ Ionen frei, wodurch das Gleichgewicht der Kohlendioxid- und Hydroxidionen Reaktion in Richtung der Karbonat Bildung verschoben wird und den pH-Wert auf einen Wert von 8.3 ansteigen lässt (Kochany et al., 1996; Kirby et al., 2009).

Eine Erklärung für das Absterben der Populationen im Hefe-Weizen-Medium ist die schwankende und sinkende Bakterienanzahl im Medium, wodurch den Paramecien pro Fütterung weniger Bakterien zur Verfügung standen. Um einen stabilen Wert in der Bakterienanzahl pro Fütterung zu erreichen, wurden die Paramecien in einem zweiten Versuch ausschliesslich mit *E. coli* Bakterien und einer konstanten Bakterienanzahl von $3.6 \cdot 10^8$ KBE/ml gefüttert. Dieser Wert lag deutlich höher als die höchste Bakterienanzahl, welche im Hefe-Weizen-Medium erreicht wurde ($1.39 \cdot 10^8$ KBE/ml). Es zeigte sich, dass mit der erhöhten Bakterienanzahl höhere Populationsdichten erreicht werden können, wobei ein ähnlicher Verlauf der Populationsentwicklung erreicht wurde. Die erreichten Populationsdichten bewegten sich jedoch immer noch im kleineren Bereich. Die Replikate der Paramecienkulturen mit *E.coli*-Medium wiesen zudem sehr unregelmässige Populationsdichten auf und zeigten nicht den erwarteten Verlauf in der Populationsentwicklung, wobei nur eine von drei Replikaten aussagekräftige Resultate lieferte. Diese zeigte jedoch einen vergleichbaren Verlauf der Populationsentwicklung wie Kulturen aus dem Hefe-Weizen-Medium, wobei sie ihre maximale Populationsdichte erst am achten Tag erreichten. Fütterungen mit $1.8 \cdot 10^9$ KBE (5 ml *E.coli*-Medium) unterdrückten das Wachstum der Paramecien und führten zu einem verfrühten Absterben der Population. Zudem waren in allen Replikaten die Populationsdichten sehr gering, und eine aussagekräftige Aussage über deren Verlauf und das Wachstum konnte nicht gemacht werden. Es

scheint, als war die Bakterienanzahl für die Paramecien zu hoch, wodurch sich die Populationen von Anfang an nicht im vollen Umfang entwickeln konnten, wodurch ein langfristigeres Überleben nicht gesichert werden konnte. Zudem wiesen die Kulturen mit 5 ml *E.coli*-Medium erheblich höhere Werte bei der elektrischen Leitfähigkeit (EC) auf als Kulturen mit nur 1 ml *E.coli*-Medium. Dies lässt sich zum einen auf die erhöhte Fütterung wie auch auf die geringere Anzahl an Paramecien, welche das Futter fressen, zurückführen.

Kultivierungen von *P. bursaria* mit *Escherichia coli* IMG 1711 zeigte Populationsdichten von ca. 23 Ind./ml über einen Versuchszeitraum von 21 Tagen. Die Kulturen wurden in 4 ml Salataufguss gehalten und mit dem Bakterium gefüttert, wobei ein Gesamtvolumen von 5 ml nicht überschritten wurde. Die Kulturen wiesen zudem einen ähnlichen Verlauf in der Populationsentwicklung auf, mit ihrem Maximum am 15. Versuchstag, und einem darauffolgenden Absterben der Population (Bator, 2010). Das spätere Erreichen der höchsten Populationsdichte und die somit längere Lebensdauer der Kultur lässt sich auf die geringe Populationsdichte von drei Paramecien zu Beginn des Versuches zurückführen. Mit den Versuchen konnte aufgezeigt werden, dass *P. bursaria* mit *E. coli* IMG 1711 kultiviert werden kann, gleich wie bei einer Kultivierung mit *E.coli* C600 starben die Populationen jedoch nach Erreichen ihres Maximums ab (Bator, 2010). Somit kann gesagt werden, dass die erhaltenen Resultate bei der Kultivierung mit *E. coli* C600 mit anderen Versuchen vergleichbar sind und den Erwartungen entsprechen.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch die erhöhte elektrische Leitfähigkeit und den somit höheren Anteil an gelösten Stoffen und die dadurch resultierende erhöhte Osmolarität die Paramecien ihre zytosolische Osmolarität nicht mehr regulieren konnten und somit abstarben. Ein starker Anstieg der äusseren Osmolarität über die zytosolische Osmolarität führt zu einer Verringerung des Zellvolumens und zur Schrumpfung der Zelle (Iwamoto et al., 2005). Der gleiche Effekt konnte beobachtet werden, wenn Paramecien in destilliertes Wasser mit einer EC von 20 $\mu\text{s}/\text{cm}$ gegeben werden. Innerhalb von zehn Minuten begannen diese zu schrumpfen, bis sie nach etwa 30 min abstarben. Durch die Zugabe einer kleinen Menge an NaCl (0.01 mol/L) in das destillierte Wasser, konnte die Lebensspanne auf 24 h ausgeweitet werden und ihre Grösse und Form war mit denjenigen der Kontrollorganismen aus einem Heuaufguss identisch. Paramecien in einer 0.1 mol/L NaCl Lösung (7'700 bis 9'700 $\mu\text{s}/\text{cm}$) starben nach 10 bis 20 Minuten ab, resistente Individuen überlebten sogar bis zu 60 min in der Lösung (Estabrook, 1910; Schudel, 2006). Vor ihrem Absterben schwellen die Tierchen teils auf das doppelte ihrer Grösse an und bewegen sich nur noch sehr langsam (Estabrook, 1910). Die, während den Versuchen maximal erreichte EC von 1954 $\mu\text{s}/\text{cm}$ liegt stark unter dem Wert von 7'700 $\mu\text{s}/\text{cm}$ wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die erhöhte EC nicht zum Absterben der Population geführt hat. Im Vergleich Meerwasser weist eine EC von 56'000 $\mu\text{s}/\text{cm}$ auf.

Genauere Untersuchungen der bakteriellen Zusammensetzung eines Heuaufgusses, die Herkunft der Bakterien und deren Einfluss auf das Wachstum von *P. aurelia* und *P. caudatum* zeigten, dass der Bakterieneintrag in die Kultur entweder direkt durch das Heu, das Wasser und/oder über die Luft geschieht. (Hargitt & Fray, 1917). Daraus kann geschlossen werden, dass die bakterielle Zusammensetzung des verwendeten Futtermediums aus diesen drei Quellen entsteht. Die Kulturen wurden insgesamt über einen Zeitraum von vier Monaten untersucht, wobei sich eine deutliche Abfolge des bakteriellen Lebens in den Kulturen, welche für lange Zeit ungestört blieben, zeigte. Proben, welche nach einigen Tagen, nach einigen Wochen und nach vier Monaten entnommen wurden, wiesen jeweils eine unterschiedliche Zusammensetzung an Bakterien auf. Es wird weiter angenommen, dass primär die später auftretenden Bakterien einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Population haben. Von den 30 am häufigsten vorkommenden Bakterien im Heuaufguss eignete sich ausschliesslich *Bacillus subtilis* als alleinstehende Nahrungsquelle für *P. aurelia*. Kulturen, welche mit *Bacillus subtilis* gefüttert wurden, erreichten vergleichbare ähnliche Populationsdichten wie Kulturen im Heuaufguss mit der darin enthaltenen Bakterienflora. Daraus lässt sich schliessen, dass *Bacillus subtilis* die Hauptnahrungsquelle für *P. aurelia* in Heuaufgüssen ist und die restlichen Bakterien eher eine untergeordnete Rolle spielen. Dies würde heissen, dass *Bacillus subtilis* die optimale Nahrungsquelle für Paramecien ist (Hargitt & Fray, 1917). Diese Annahme wurde jedoch von Bator (2010) widerlegt in dem er *P. bursaria* mithilfe von *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* IMG 1711 kultivierte, wobei sich *Escherichia coli* IMG 1711 als geeignete Nahrungsquelle etablierte und die höchsten Populationsdichten an *P. bursaria* erzeugte. Da *P. bursaria* eine Symbiose mit Grünalgen eingeht und sich darin von *P. aurelia* unterscheidet, kann angenommen werden, dass diese Arten möglicherweise unterschiedliche Präferenzen in der Nahrung aufweisen (Hargitt & Fray, 1917; Bator, 2010). *Bacillus subtilis* bleibt demnach weiterhin eine wichtige Nahrungsquelle zur Kultivierung von Paramecien. Trotz dieser Erkenntnis ergab sich, dass ein Mix aus Bakterien jeweils besser geeignet ist als nur eine einzelne Bakterienkultur. Heuaufgüsse mit Faulungsprozessen dagegen waren für die Paramecien toxisch, was zu einem Absterben der Population innerhalb weniger Tage führte. (Hargitt & Fray, 1917). Somit kann angenommen werden, dass sich Paramecien von mehreren geeigneten Bakterienarten ernähren können, welche im Mix möglicherweise das ideal Futtermittel darstellen könnten. Dabei ist jedoch anzunehmen, dass die Zusammensetzung dieses Gemisches von Art zu Art innerhalb der Gattung *Paramecium* variiert. Weiter stellt sich die Frage, ob eine kontinuierliche Kultivierung mittels Heuaufgüssen oder Hefe-Weizen-Medien überhaupt möglich ist. Es ist anzunehmen, dass sich die in den Heuaufgüssen ergeben Veränderungen der Bakterienflora über die Zeit auch im Hefe-Weizen-Medium und weiteren Medien mit unkontrolliertem Bakterienwachstum ergeben. Dadurch wäre ein Absterben der Population aufgrund von Veränderungen in der Bakterienflora vorhersehbar und unausweichlich. Für eine kurzfristige Kultivierung ist ein Kultivierung direkt im Medium zu empfehlen, da im Vergleich zu einer Fütterung erheblich höhere Populationsdichten erreicht werden können. Um die Aussagen endgültig bestätigen zu können wäre es wichtig ein genaues Bild von der

Bakterienzusammensetzung im Futtermedium und dessen Entwicklung zu bekommen. Weiter wäre es interessant wie viele Bakterien ein *Paramecium* pro Tag fressen kann.

Ein weiterer Einfluss auf die Bakterienflora und den Rückgang der Paramecien Populationen könnte sein, dass die Paramecien ab einem gewissen Zeitpunkt den Grossteil der für sie optimalen Bakterien aufgefressen hatten. Dadurch waren nur noch Bakterien verfügbar, welche ihnen zwar zum Überleben genügten, jedoch keine hohen Populationsdichten ermöglichten. Ein anderer Ansatz ist, dass die Paramecien die für sie geeigneten Bakterien reduzierten, wodurch der Konkurrenzdruck auf eher suboptimale Bakterien sank, sich diese stärker vermehren konnten und zusätzlich Druck auf die geeigneten Bakterien ausübten und diese weiter reduzierten (Hargitt & Fray, 1917). Dies trifft jedoch nur auf Kulturen zu, welche direkt im Futtermedium kultiviert wurden. Bei einer Fütterung spielt diese Problematik keine Rolle. Hierbei ist es wahrscheinlicher, dass Veränderungen in der Zusammensetzung der Bakterienflora im Futtermedium über den Versuchszeitraum einen negativen Einfluss auf das Wachstum hatten. Dadurch standen weniger bevorzugte Bakterienarten zur Verfügung, wodurch es zu einem Einbruch der Population kam. Diese Theorie unterstützt die schon erwähnte Annahme, dass eine kontinuierliche Kultivierung von Paramecien mittels Futtermedien, welche ein zufälliges Bakterienwachstum aufweisen, nicht optimal ist. Es macht den Anschein, dass eine längerfristige Kultivierung hauptsächlich mit extern produzierten und spezifischen Bakterienarten möglich ist. Eine weitere Variante wäre das mittels kontinuierlicher Erneuerung des Futtermediums, jeweils die optimale Bakterienflora erzeugt wird.

Neben den Versuchen wurden über den gesamten Zeitraum jeweils Stammkulturen von *P. caudatum* gehalten, um sie für die Kultivierung verwenden zu können. Diese Kulturen waren nicht Teil der Versuche und alle nun aufgeführten Erkenntnisse, basieren auf Beobachtungen dieser Stammkulturen im Hefe-Weizen-Medium. Da die Kulturen nicht belüftet wurden ist anzunehmen, dass durch den Mangel an Sauerstoff Faulungsprozesse einsetzten und sich eine dafür angepasste Bakterienflora bildete. Diese sind jedoch toxisch für die Paramecien und haben durch ihre Aktivität einen Einfluss auf das Umgebungsmedium, welcher sich negativ auf das Wachstum der Population auswirkt. Das Einsetzen von Faulungsprozessen zeigte sich an einem stechenden Geruch, welcher sich in den ersten Tagen nach ansetzen der Kultur bildete. Diese Kulturen wiesen dann auch sehr geringe Populationsdichten auf und zeigten mit der Zeit nur einen langsamen Zuwachs der Population. Das Umgebungsmedium der Kulturen wies zudem eine starke gelbliche Trübung mit einer dicken Biofilmschicht an der Oberfläche auf. Kulturen, welche zu Beginn hohe Populationsdichten aufwiesen, zeigten in den ersten paar Tagen ein stark erhöhtes Wachstum, das Umgebungsmedium blieb klar mit der typischen leicht gelblichen Färbung und es bildete sich ein wesentlich feinerer Biofilm auf der Wasseroberfläche. Aus diesen Beobachtungen konnte somit geschlossen werden, dass sich bei zu kleinen Populationsdichten, die hohe Bakterienaktivität negativ auf das Wachstum der Paramecien auswirkt. Dem kann jedoch relativ einfach

entgegengewirkt werden, indem die Kulturen mit einer erhöhten Anzahl an Paramecien angeimpft werden. Somit zeigten Kulturen, welche mit 10 ml einer Vorkultur mit 15 Ind./ml angeimpft wurden, einen schlechteren Start und somit geringere Populationsdichten auf als Kulturen, welche mit 50 ml und ca. 160 Ind./ml angeimpft wurden. Das eine hohe Bakterienanzahl das Wachstum der Paramecien unterdrücken kann zeigte sich auch bei einer erhöhten Fütterung mit *E. coli* Bakterien, bei welcher nur ein sehr geringes Wachstum der Paramecien festgestellt werden konnte. Somit würde eine Fütterung, welche an das Wachstum der Population gekoppelt ist Sinn machen. Je nach Entwicklung der Population würde auch die Fütterungsmenge angepasst werden, dafür müsste jedoch vorgängig eruiert werden, wie viele Bakterien eines Mediums von einem Paramecium pro Tag umgesetzt werden.

5 Fazit

Eine Kultivierung von *P. caudatum* mittels Fütterung eines Hefe-Weizen-Mediums und *Escherichia coli* C600 ist möglich aber noch zu ineffizient. Die erreichten Populationsdichten von 47 Ind./ml mit dem Hefe-Weizen-Medium waren im Vergleich zu Kulturen, welche direkt im Futtermedium kultiviert wurden, um einiges niedriger. Weiter konnte ein Rückgang der Bakterienanzahl im Hefe-Weizen-Medium festgestellt werden. Daraus lässt sich schliessen, dass die Population aufgrund des entstanden Futtermangels einbrach. Die Kultivierung mit *E. coli* erzielte höhere Populationsdichten von 140 Ind./ml, dies lässt sich auf eine konstante höhere Bakterienanzahl in der Fütterungsmenge zurückführen. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine Fütterung von $1.8 \cdot 10^9$ *E. coli* Bakterien schädlich für das Wachstum der Paramecien ist und dieses hemmt. Die Kultivierung mit *E. coli* wies zudem sehr unregelmässige Populationsdichten auf, wobei nur in einem von drei Replikaten verwendbare Resultate erzielt werden konnten. Durch die konstante Belüftung stieg der pH-Wert in allen Kulturen stetig bis auf einen Wert von 8.7 an, welcher sich somit in einem Bereich bewegte, der nicht für Paramecien geeignet ist. Zum Zeitpunkt der höchsten Populationsdichte wiesen die Kulturen einen pH-Wert von >8.0 auf, was darauf schliessen lässt, dass dies ein weiterer Grund für das Einbrechen der Kultur ist. Die Temperatur und die Sauerstoffsättigung konnten während der Versuche im optimalen Bereich gehalten werden und hatten somit keinen negativen Einfluss auf das Wachstum.

6 Ausblick und Hinweise für zukünftige Experimente

Für zukünftige Experimente sollte darauf geachtet werden, die Populationen mit einer ausreichend hohen Anzahl an Individuen anzusetzen. Für Kulturen mit einem Volumen von 1 L eigneten sich 50 ml Stammkultur mit 160 Ind./ml. Es ist auch denkbar zu Beginn mit einer geringeren Anzahl an Bakterien zu füttern und diese mit dem Wachstum der Population stetig zu erhöhen, um einen zu hohen Druck der Bakterien auf die Population zu verhindern. Weiter sollte darauf geachtet werden, den pH-Wert stabil in einem Bereich um 7.5 zu halten, wobei darauf geachtet werden muss, dass

eine Belüftung mittels Druckluft den pH-Wert ansteigen lässt. Sauerstoffsättigungen von ca. 100 % und Temperaturen von 22 bis 27 °C sind optimal für eine Kultivierung von *P. caudatum*. Zu beachten ist, dass eine geringere Temperatur auch ein langsames Wachstum bedingt, die Kulturen jedoch stabiler sind als bei höheren Temperaturen. Weiter scheint *P. aurelia* eine höhere Zellteilung aufzuweisen als *P. caudatum*, wodurch sich die Art besser zur Kultivierung von Lebendfutter eignen würde. Für ein besseres Verständnis des Futtermediums sollte während des Versuches auch die Bakterienzusammensetzung im Futtermedium ermittelt werden. Zudem wäre es interessant zu wissen, wie viele Bakterien von den Paramecien in einer gewissen Zeitspanne umgesetzt werden, um die Fütterungsmengen dementsprechend anpassen zu können.

7 Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst meinen Betreuern Dominik Refardt und Fridolin Tschudi der Forschungsgruppe Aquakultur-Systeme für ihre Unterstützung und Betreuung der Arbeit und Versuche. Weiter möchte ich Mathias Sigrist für seine Unterstützung und Hilfe im Aquakulturlabor danken. Mein weiterer Dank gilt dem Laborteam des GA109 bestehend aus Sophia Egloff, Christa Gufler und Marina Mariotto für ihre Unterstützung und Hilfe bei den Laborarbeiten. Weiter möchte ich mich bei Esther Fischer und Ursula Löffel von der Forschungsgruppe Phytomedizin für die Bereitstellung des LB-Mediums, der Autoklaven und des Inkubators bedanken. Abschliessend danke ich noch Lars Fieseler für das Bereitstellen der *E. coli* C600 Kultur.

Literaturverzeichnis

- Adolph, E. F. (1943). Physiological regulations. The Jacques Cattell Press.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.6393>
- Baier, D. (2020). Kultivierung von *Paramecium caudatum* als Lebendfutter in der Fischzucht [Bachelorarbeit]. Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften ZHAW.
- Bator, T. (2010). A new laboratory cultivation of *Paramecium bursaria* using non-pathogenic bacteria strains. Zeitschrift Für Naturforschung, 65(7–8), 479–482.
<https://doi.org/10.1515/znc-2010-7-810>
- Cotter, D. (2018). Produktive Kultivierung von Paramecien [Semesterarbeit 2]. Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften ZHAW.
- Estabrook, A. H. (1910). Effect of chemicals on growth in *Paramecium*. Journal of Experimental Zoology, 8(4), 489–534. <https://doi.org/10.1002/jez.1400080405>
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. FAO.
<https://doi.org/10.4060/ca9229en>

- Görtz, H.-D., Adoutte, A., & Preer, J. R. J. (1988). *Paramecium*. Springer Berlin.
<https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-73086-3>
- Hargitt, Geo. T., & Fray, W. W. (1917). The growth of *Paramecium* in pure cultures of bacteria. *Journal of Experimental Zoology*, 22(2), 421–455.
<https://doi.org/10.1002/jez.1400220206>
- Hofrichter, R., Gregus, M., & Volker, C. (Hrsg.). (2020). *Das Mittelmeer: Geschichte und Zukunft eines ökologisch sensiblen Raums* (2. Auflage). Springer.
- Iwamoto, M., Sugino, K., Allen, R. D., & Naitoh, Y. (2005). Cell volume control in *Paramecium*: Factors that activate the control mechanisms. *Journal of Experimental Biology*, 208(3), 523–537. <https://doi.org/10.1242/jeb.01417>
- Jennings, H. S. (1906). *Behavior of the lower organisms*. The Columbia university press, The Macmillan company. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.4123>
- Jennings, H. S. (1908). Heredity, variation and evolution in *Protozoa*. II. Heredity and variation of size and form in *Paramecium*, with studies of growth, environmental Action and Selection. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 47(190), 393–546. JSTOR.
- Kirby, C. S., Dennis, A., & Kahler, A. (2009). Aeration to degas CO₂, increase pH, and increase iron oxidation rates for efficient treatment of net alkaline mine drainage. *Applied Geochemistry*, 24(7), 1175–1184. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2009.02.028>
- Kitching, J. A. (1939). The Effects of a lack of oxygen and of low oxygen tensions on *Paramecium*. *Biological Bulletin*, 77(3), 339–353. JSTOR. <https://doi.org/10.2307/1537643>
- Kochany, J., Lugowski, A., Menkal, V., & Erickson, P. L. M. (1996). Tailing pond remediation in the Canadian arctic. *Environmental Technology*, 17(10), 1113–1121.
<https://doi.org/10.1080/09593331708616480>
- Lavens, P., & Sorgeloos, P. (2000). The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture*, 181(3–4), 397–403.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00233-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00233-1)
- Lilly, D. M., & Klosek, R. C. (1961). A protein factor in the nutrition of *Paramecium caudatum*. *Journal of General Microbiology*, 24(3), 327–334. <https://doi.org/10.1099/00221287-24-3-327>
- Meske, Ch. (1971). Warmwasser-Fischzucht neue Verfahren der Aquakultur. *Naturwissenschaften*, 58(6), 312–318. <https://doi.org/10.1007/BF00624736>

- Nagarajan, P., Gudde, R., & Srinivasan, R. (2021). Essentials of laboratory animal science: Principles and practices. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-0987-9>
- Nakatani, I. (1968). Chemotactic response of *Paramecium caudatum*. Journal of the Faculty of Science Hokkaido University Series VI. ZOOLOGY, 16(4), 553–563.
- Sathe, T. (2011). Laboratory mass culture technique for *Paramecium caudatum* (Protozoa: Paramecidae). Journal of Current sciences, 16, 133–135.
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. Database, 2020, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Schudel, M. (2006). Leitfähigkeit in der Chemie. Bildungsportal der ETH Zürich. https://ethz.ch/content/dam/ethz/special-interest/dual/educeth-dam/documents/Unterrichtsmaterialien/chemie/Leitf%C3%A4higkeit/Schudel_Lipsche_r_Leitfahigkeit_v2_mit_deckblatt.pdf
- Soldo, A. T., & Van Wagtenonk, W. J. (1969). The Nutrition of *Paramecium aurelia*, Stock 299. The Journal of Protozoology, 16(3), 500–506. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1969.tb02307.x>
- Sorgeloos, P., Dhert, P., & Candreva, P. (2001). Use of the brine shrimp, *Artemia spp.*, in marine fish larviculture. Advanced Biotechnology in Hatchery Production, 200(1), 147–159. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00698-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00698-6)
- Statista. (2022). Fischkonsum weltweit 2021. Statista. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/292994/umfrage/fischkonsum-weltweit-nach-regionen/>
- Stockton-Fiti, K. A., & Moffitt, C. M. (2017). Safety and efficacy of Virkon aquatic as a control tool for invasive Molluscs in aquaculture. Aquaculture, 480, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.005>
- Streble, H., & Krauter, D. (2012). Das Leben im Wassertropfen: Mikroflora und Mikrofauna des Süßwassers; ein Bestimmungsbuch (12. Aufl.). Kosmos.
- Takagi, Y., & Yoshida, M. (1980). Clonal death associated with the number of fissions in *Paramecium caudatum*. Journal of Cell Science, 41(1), 177–191. <https://doi.org/10.1242/jcs.41.1.177>
- Tawada, K., & Oosawa, F. (1972). Responses of *Paramecium* to temperature change. The Journal of Protozoology, 19(1), 53–57. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1972.tb03412.x>

Thiele, J., D., O., WAHL, J., KLEEFELD, G., & Schultz, J. (1980). A new method for axenic mass cultivation of *Paramecium tetraurelia*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 27, 118–121. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1980.tb04240.x>

Van Wagendonk, W. J. (1974). *Paramecium*. A current survey. *The Journal of Protozoology*, 22(1), 30–30. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1975.tb00940.x>

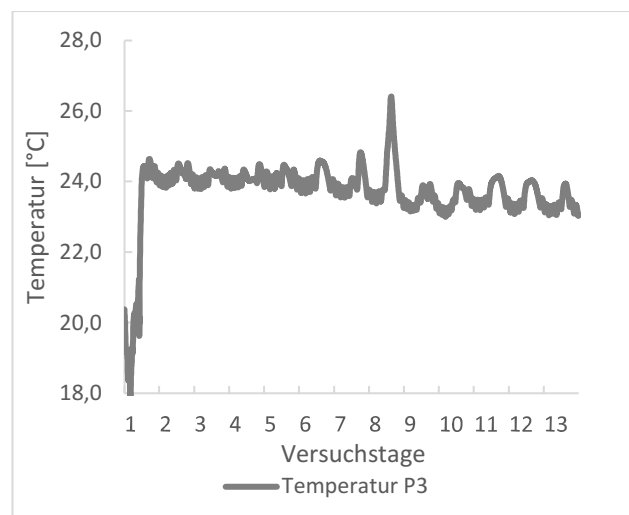
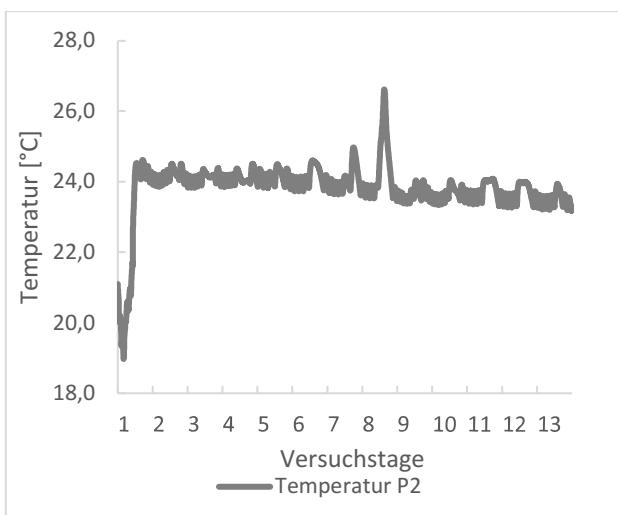
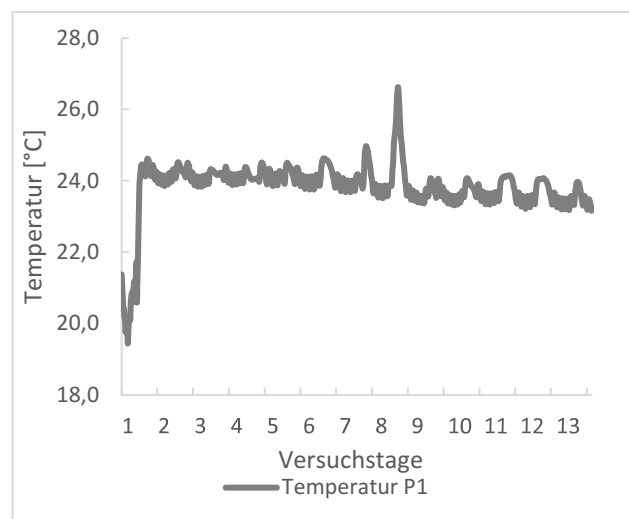
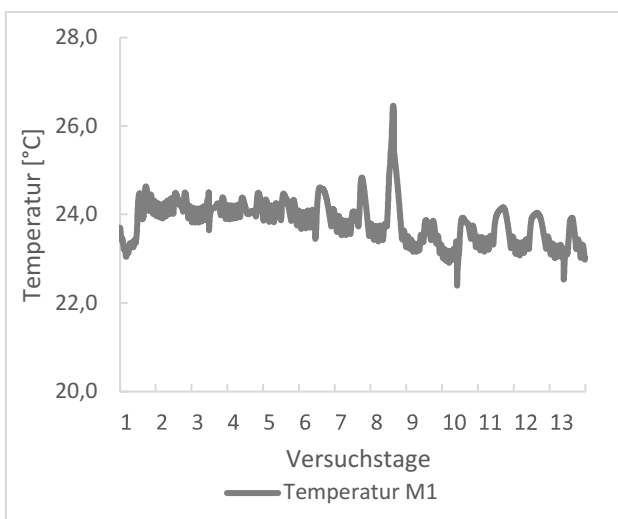
Westerfield, M. (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) (4th Aufl.). Univ. of Oregon Press.

Wichterman, R. (1986). The Biology of *Paramecium* (2nd Aufl.). Plenum Press. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4757-0372-6#about>

Anhang

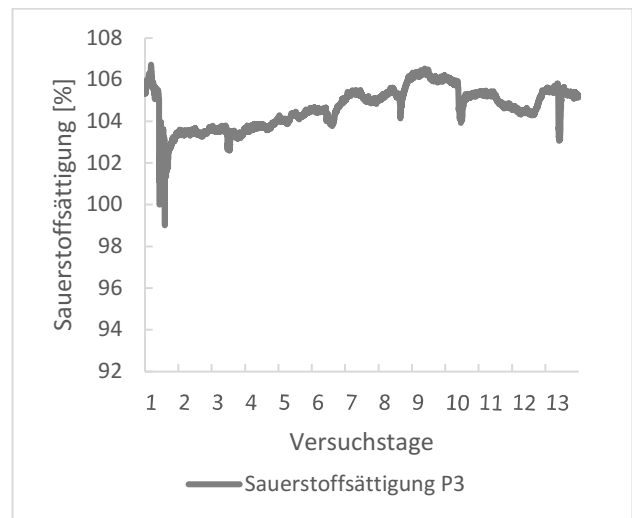
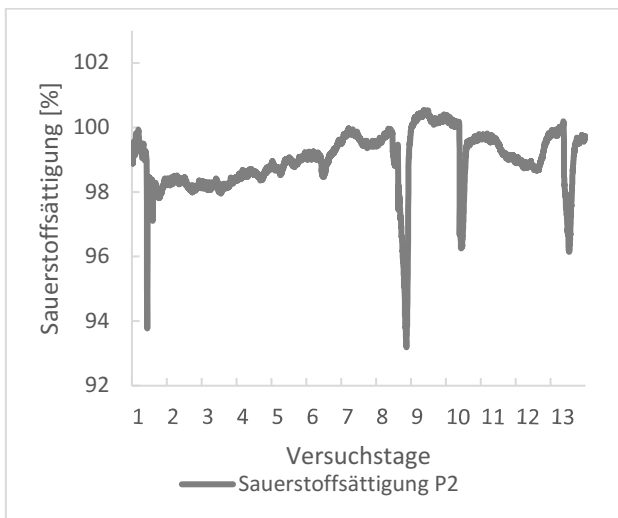
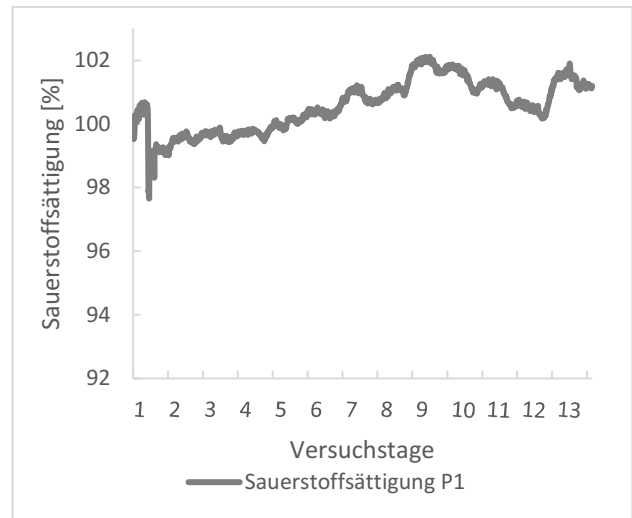
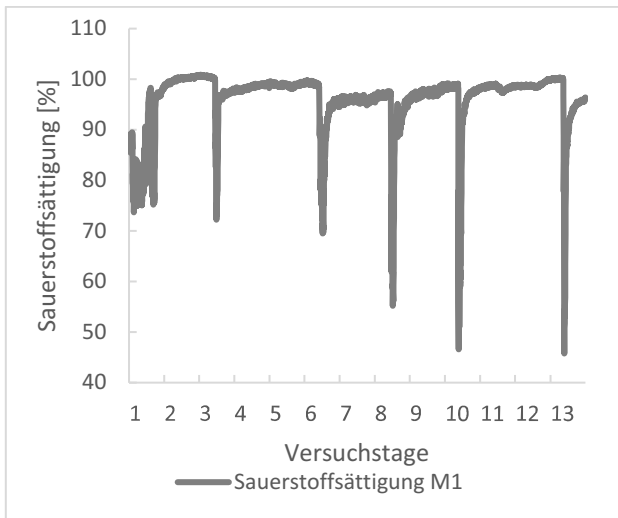
1. Temperatur LDO-Sonde

Anhang 1: Kontinuierliche Messung der Temperatur mittels LDO-Sonde in den Gallonen P1–P3 wie auch M1 über den gesamten Versuchszeitraum von 13 Tagen.



2. Sauerstoffsättigung LDO-Sonde

Anhang 2: Kontinuierliche Messung der Sauerstoffsättigung mittels LDO-Sonde in den Gallonen P1–P3 wie auch M1 über den gesamten Versuchszeitraum von 13 Tagen.



3. Laborprotokoll Hefe-Weizen-Medium

Anhang 3: Laborprotokoll des ersten Versuches mit Hefe-Weizen Medium.

Versuchstag	Datum	Gallone	Geerntet [dl]	Paramecien vor Ernte [Ind/ml]	Paramecien nach Ernte [Ind/ml]	Paramecien Total (15L)	Gefüttert [dl]	Ausgezählte Bakterien [KBE/ml]	pH	Sauerstoffkonzentration [mg/L]	Sauerstoffsättigung [%]	Temperatur [°C]	elektrische Leitfähigkeit [µs/cm]
1	22.09.2021	M1	21	-	-	-	21	5,22E+07	7,85	8,5	89,22	23,5	435
		P1	0		2	2	30 000	1	8,47	8,12	99,37	24,2	372
		P2	0		5	5	75 000	4	8,37	8,17	98,12	24,1	375
		P3	0		4	4	60 000	16	8,26	8,05	101,93	24,1	379
3	24.09.2021	M1	21	0	0	-	21	1,39E+08	8,28	6,81	100,2	24,3	462
		P1	0		1	1	15 000	1	8,66	8,24	99,76	24,3	372
		P2	0		4	4	60 000	4	8,65	8,18	98,27	24,3	375
		P3	0		7	7	105 000	16	8,61	8,16	103,73	24,3	382
6	27.09.2021	M1	21	0	0	-	21	-	8,38	6,81	98,75	24	532
		P1	0		7	7	105 000	1	8,62	8,38	100,3	24,1	377
		P2	0		12	12	180 000	4	8,65	8,35	99	24,1	385
		P3	0		47	47	705 000	16	8,62	8,69	104,5	24,1	400
8	29.09.2021	M1	21	0	0	-	21	2,80E+04	8,42	6,71	97,11	23,7	546
		P1	1		3	2	45 000	1	8,64	8,54	101	23,8	400
		P2	4		5	6	75 000	4	8,68	8,47	99,78	23,8	392
		P3	16		37	37	555 000	16	8,66	8,42	105,44	23,7	413
10	01.10.2021	M1	21	0	0	-	21	2,20E+05	8,41	7,02	98,72	23,1	556
		P1	1		0	1	-	1	8,62	8,65	101,62	23,4	391
		P2	4		5	2	75 000	4	8,67	8,61	100,11	23,4	399
		P3	16		9	18	135 000	16	8,67	8,61	105,8	23,2	427
13	04.10.2021	M1	21	0	0	-	21	2,60E+05	8,36	6,68	100,1	23	557
		P1	1		0	0	-	1	8,65	8,64	101,8	23,2	393
		P2	4		3	3	45 000	4	8,69	8,54	100	23,2	406
		P3	16		8	8	120 000	16	8,71	8,54	105,7	23,1	438

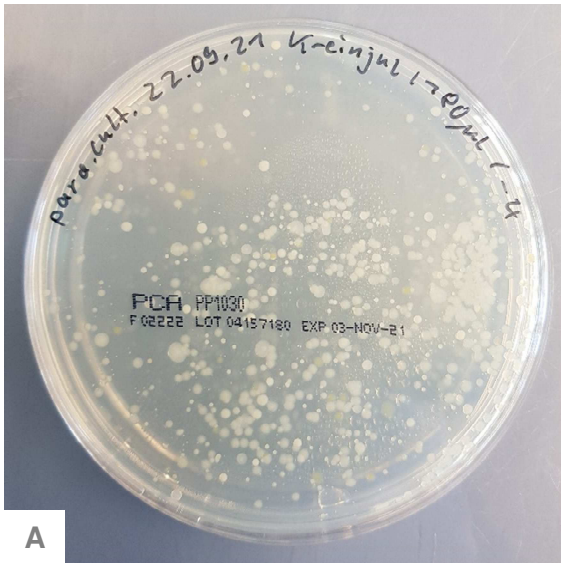
4. Laborprotokoll *E. coli*

Anhang 4: Laborprotokoll des zweiten Versuches mit *E. coli*-Medium

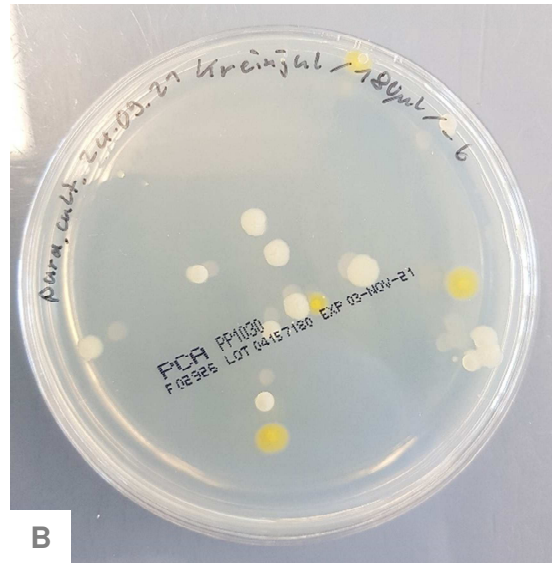
Versuchstag	Datum	Versuchsreihe	Versuchsreihe	Kolben	Paramecien [Ind/ml]	pH	Sauerstoffkonzentration	Sauerstoffsättigung	Temperatur [°C]	elektrische Leitfähigkeit [µs/cm]	
1	27.10.2021	1	1	1,1	0	7,26	7,95	96,7	22	466	
				1,2	0	7,19	7,82	95,5	22,2	483	
				1,3	0	7,22	7,93	96,1	21,4	496	
				2,1	0	7,21	8,05	97,5	21	483	
				2,2	0	7,20	7,72	95,3	21,7	489	
				2,3	0	7,19	7,82	96,1	21,8	487	
		Mittelwert V1				0,00	7,22	7,90	96,10	21,87	481,67
		Mittelwert V2				0,00	7,20	7,86	96,30	21,50	486,33
		Standardabweichung V1				0,00	0,04	0,07	0,60	0,42	15,04
		Standardabweichung V2				0,00	0,01	0,17	1,11	0,44	3,06
		Upper band V1				0,00	7,26	7,97	96,70	22,28	496,71
		Upper band V2				0,00	7,21	8,03	97,41	21,94	489,39
		Lower Band V1				0,00	7,19	7,83	95,50	21,45	466,62
		LowerBand V2				0,00	7,19	7,69	95,19	21,06	483,28
3	29.10.2021	3	1	1,1	0	7,60	7,97	98	22,5	73	
				1,2	0	7,46	7,9	97,1	22,5	76	
				1,3	0	7,55	7,9	96,8	22,4	76	
				2,1	0	7,80	7,85	96	22,2	370	
				2,2	1	8,04	7,84	96	22,4	460	
				2,3	1	8,06	7,8	95,5	22,3	475	
		Mittelwert V1				0,00	7,54	7,92	97,30	22,47	74,87
		Mittelwert V2				0,67	7,97	7,83	95,83	22,30	435,00
		Standardabweichung V1				0,00	0,07	0,04	0,62	0,06	1,54
		Standardabweichung V2				0,58	0,14	0,03	0,29	0,10	56,79
		Upper band V1				0,00	7,61	7,96	97,92	22,52	76,40
		Upper band V2				1,24	8,11	7,86	96,12	22,40	491,79
		Lower Band V1				0,00	7,47	7,88	96,68	22,41	73,33
		LowerBand V2				0,09	7,82	7,80	95,54	22,20	378,21
6	01.11.2021	6	1	1,1	0	8,08	7,98	98	22,5	427	
				1,2	18	7,86	7,92	97,7	22,6	164	
				1,3	8	7,74	7,87	96,9	22,4	152	
				2,1	2	8,25	7,89	97	22,4	726	
				2,2	1	8,29	7,72	95	22,5	810	
				2,3	2	8,32	7,74	95,2	22,4	835	
		Mittelwert V1				8,67	7,89	7,92	97,53	22,50	158,10
		Mittelwert V2				1,67	8,29	7,78	95,73	22,43	790,33
		Standardabweichung V1				9,02	0,17	0,06	0,57	0,10	8,06
		Standardabweichung V2				0,58	0,04	0,09	1,10	0,06	57,10
		Upper band V1				17,69	8,07	7,98	98,10	22,60	166,16
		Upper band V2				2,24	8,32	7,88	96,83	22,49	847,43
		Lower Band V1				-0,35	7,72	7,87	96,96	22,40	150,04
		LowerBand V2				1,09	8,25	7,69	94,63	22,38	733,23
8	03.11.2021	8	1	1,1	14	8,08	7,61	95,4	22,9	526	
				1,2	140	7,85	7,78	97,6	23	243	
				1,3	0	7,40	7,69	94,2	21,8	240	
				2,1	0	8,35	7,77	95,5	21,9	1098	
				2,2	1	8,38	7,66	95,4	22,6	1173	
				2,3	0	8,43	7,68	95,1	22,3	1194	
		Mittelwert V1				51,33	7,78	7,69	95,73	22,57	336,33
		Mittelwert V2				0,33	8,39	7,70	95,33	22,27	1155,00
		Standardabweichung V1				77,11	0,35	0,09	1,72	0,67	164,26
		Standardabweichung V2				0,58	0,04	0,06	0,21	0,35	50,47
		Upper band V1				128,44	8,12	7,78	97,46	23,23	500,60
		Upper band V2				0,91	8,43	7,76	95,54	22,62	1205,47
		Lower Band V1				-25,77	7,43	7,61	94,01	21,90	172,07
		LowerBand V2				-0,24	8,35	7,64	95,13	21,92	1104,53
10	05.11.2021	10	1	1,1	19	8,26	8,04	97,2	22,3	595	
				1,2	72	8,03	7,97	96,3	22,2	308	
				1,3	0	7,85	7,95	94,8	21,5	272	
				2,1	0	8,44	7,96	95,6	21,9	1271	
				2,2	0	8,53	7,92	95,6	22,2	1407	
				2,3	0	8,52	7,91	95,7	22,3	1370	
		Mittelwert V1				30,33	8,05	7,99	96,10	22,00	391,67
		Mittelwert V2				0,00	8,50	7,93	95,63	22,13	1349,33
		Standardabweichung V1				37,31	0,21	0,05	1,21	0,44	177,01
		Standardabweichung V2				0,00	0,05	0,03	0,06	0,21	70,32
		Upper band V1				67,65	8,25	8,03	97,31	22,44	568,68
		Upper band V2				0,00	8,55	7,96	95,69	22,34	1419,65
		Lower Band V1				-6,98	7,84	7,94	94,89	21,56	214,66
		LowerBand V2				0,00	8,45	7,90	95,58	21,93	1279,02
13	08.11.2021	13	1	1,1	5	8,20	7,87	96,1	22,7	678	
				1,2	23	8,00	7,92	96,5	22,6	402	
				1,3	0	7,83	7,86	93,6	21,4	405	
				2,1	0	8,41	7,92	95,6	22,1	1607	
				2,2	0	8,53	7,92	96	22,2	1720	
				2,3	0	8,49	7,89	95,5	22,2	1685	
		Mittelwert V1				9,33	8,01	7,88	95,40	22,23	495,00
		Mittelwert V2				0,00	8,48	7,91	95,70	22,17	1670,67
		Standardabweichung V1				12,10	0,19	0,03	1,57	0,72	158,49
		Standardabweichung V2				0,00	0,06	0,02	0,26	0,06	57,85
		Upper band V1				21,43	8,20	7,92	96,97	22,96	653,49
		Upper band V2				0,00	8,54	7,93	95,96	22,22	1728,51
		Lower Band V1				-2,76	7,82	7,85	93,83	21,51	336,51
		LowerBand V2				0,00	8,42	7,89	95,44	22,11	1612,82
15	10.11.2021	15	1	1,1	3	7,96	7,59	93,1	23,1	754	
				1,2	4	7,97	7,86	95,9	22,8	472	
				1,3	0	7,79	7,81	94,2	22,1	505	
				2,1	0	8,42	7,95	96,4	22,4	1900	
				2,2	0	8,49	7,96	96,5	22,4	1977	
				2,3	0	8,47	7,93	96,4	22,5	1985	
		Mittelwert V1				2,33	7,91	7,75	94,40	22,67	577,00
		Mittelwert V2				0,00	8,46	7,95	96,43	22,43	1954,00
		Standardabweichung V1				2,08	0,10	0,14	1,41	0,51	154,17
		Standardabweichung V2				0,00	0,04	0,02	0,06	0,06	46,94
		Upper band V1				4,41	8,01	7,90	95,81	23,18	731,17
		Upper band V2				0,00	8,50	7,96	96,49	22,49	2000,94
		Lower Band V1				0,25	7,81	7,61	92,99	22,15	422,83
		LowerBand V2				0,00	8,42	7,93	96,38	22,38	1907,06

5. Mikrobielle Belastung des Futtermediums

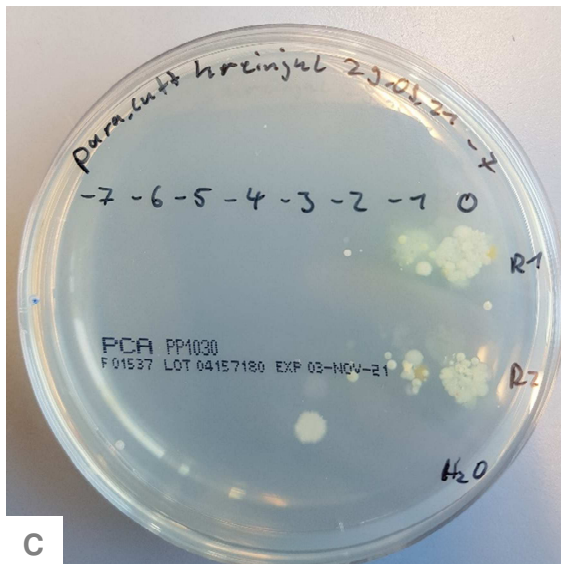
Anhang 5: Agarplatten mit den über 48 h gewachsenen Bakterienkolonien. Abbildung A zeigt die gewachsenen Bakterien vom 1. Versuchstag (22.09.21) bei einer Verdünnung von 10^4 . B ist vom 3. Versuchstag (24.09.21) mit einer Verdünnung von 10^6 . C zeigt das Wachstum am 8. Versuchstag (29.09.21) mit einer Verdünnung von 10^1 . D ist vom 10. Versuchstag (01.10.21) Verdünnung 10^2 . E bildet den 13. Versuchstag (04.10.21) ab mit einer Verdünnung von 10^2 .



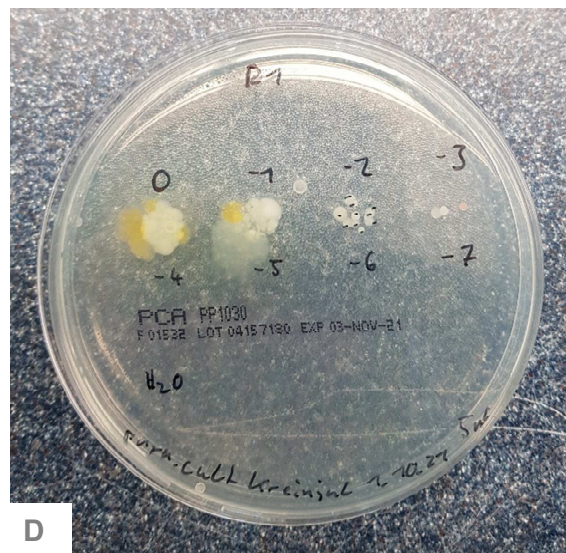
A



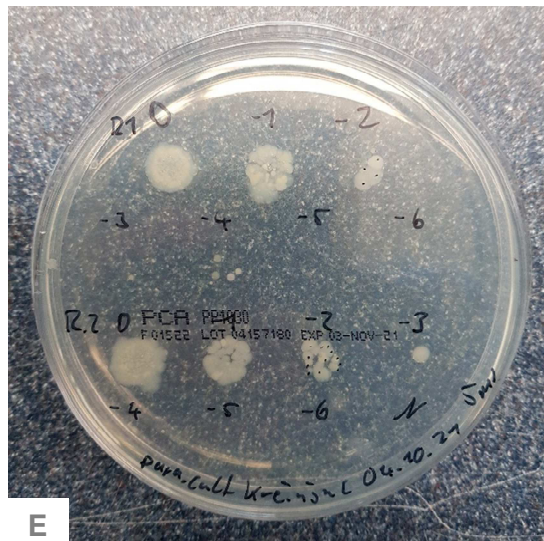
B



C



D



E

6. Berechnung KBE/ml

Anhang 6: Berechnungstabelle für die KBE pro ml der originalen Probe.

Versuchstag	Datum	Anzahl KBE	Verdünnung	Volumen [μ l]	KBE/ μ l	KBE/ml	Konzentration Original Probe [KBE/ml]
1	22.09.2021	940	10 000	180	5,222	5 222,2	5,22E+07
3	24.09.2021	25	1 000 000	180	0,139	138,9	1,39E+08
6	27.09.2021						
8	29.09.2021	14	10	5	2,8	2800	2,80E+04
10	01.10.2021	11	100	5	2,2	2200	2,20E+05
13	04.10.2021	13	100	5	2,6	2600	2,60E+05

7. IUNR-Artikel

1 Neues Lebendfutter für die Aquakultur

Das Dilemma mit den Salzwasserkrebsen (*Artemia*) und der Überfischung der Weltmeere

Der Fisch ist seit Jahrhunderten fester Bestandteil in der Ernährung des Menschen und dient ca. 3. Mrd. Menschen als primäre Eiweissquelle. Die hohe Nachfrage hat jedoch auch ihre Schattenseiten. Im Jahre 2018 galten 33 % der weltweiten Fischbestände als überfischt und eine natürliche Versorgung kann ökologisch und nachhaltig nicht mehr sichergestellt werden. Abhilfe sollen hier die Aquakulturen bieten, in welchen Fische in offenen oder abgeschlossenen Systemen aufgezogen und gezüchtet werden. Für die Aufzucht von Fischen benötigt es jedoch wiederum grosse Mengen an Lebendfutter.

Problematik

Momentan werden vor allem Salzwasserkrebse, der Gattung *Artemia*, als Lebendfutter für die Aufzucht von juvenilen Fische genutzt. Diese sind nicht nur einfach zu handhaben, sondern können auch in einer hohen Anzahl produziert werden. Ein Nachteil von diesen Salzwasserkrebsen ist jedoch die Tatsache, dass sie selbst eine natürliche Ressource sind, was bedeutet, dass sie aus ihrem natürlichen Habitat, dem Great Salt Lake in Utah USA, entnommen werden müssen und nicht speziell für die Fischzucht gezüchtet werden. Klimaveränderungen und erhöhte Niederschläge in der Region um den Great Salt Lake, veränderte jedoch die Salinität des Sees über die Jahre so stark, dass es zu einem Massensterben der Salzwasserkrebse kam, worauf es zu massive Ernteeinbrüche bei den *Artemia*-Zysten (Eier der Salzwasserkrebse) kam. Neben der limitierten Verfügbarkeit der Krebse können sie auch nicht an alle Fischarten verfüttert werden. Für sehr kleine Fische sind die 2 cm grossen Tiere schlichtweg zu gross, weiter kann es passieren, dass die zurückbleibenden Schalentelle der Krebseiern von den Fischen verschluckt werden und diese verletzen. Eine Alternative dafür bildet das wesentlich kleinere Zooplankton wie die Räder- oder Pantoffeltierchen.



Abbildung 1: Einsammeln der *Artemia*-Zysten (<https://naturalresources.utah.gov/dnr-newsfeed/get-to-know-great-salt-lake>)

8. Plagiatserklärung

Erklärung betreffend selbstständige Verfassen einer Bachelorarbeit im Departement Life Sciences und Facility Management. Mit der Abgabe dieser Bachelorarbeit versichert Julian Kreiner, dass er die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst hat. Der unterzeichnende Studierende erklärt, dass alle verwendeten Quellen (auch Internetseiten) im Text oder Anhang korrekt ausgewiesen sind, d.h. dass die Bachelorarbeit keine Plagiate enthält, also keine Teile, die teilweise oder vollständig aus einem fremden Text oder einer fremden Arbeit unter Vorgabe der eigenen Urheberschaft bzw. ohne Quellenangabe übernommen worden sind. Bei Verfehlungen aller Art treten Paragraph 39 und Paragraph 40 der Rahmenprüfungsordnung für die Bachelor- und Masterstudiengänge an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften vom 29. Januar 2008 sowie die Bestimmungen der Disziplinarmaßnahmen der Hochschulordnung in Kraft.

Ort, Datum: Wädenswil, 13.01.2022

Unterschrift:

