

Kritische Zeiten für Fischlarven – Bestimmung der Trypsinaktivität zur Beurteilung des Ernährungszustands von Fischlarven in Labor- und Felduntersuchungen – ein Überblick

Critical times for fish larvae – Measurement of tryptic activity in order to assess the nutritional condition of fish larvae from laboratory rearing and from field samples – an overview

Bernd Ueberschär

Leibniz-Institut für Meereswissenschaften (IfM-Geomar), Forschungsbereich Marine Ökologie (FB 3), Arbeitsgruppe Fischereibiologie, Düsternbrooker Weg 20, D-24105 Kiel, Germany; bueberschaer@ifm-geomar.de

Zusammenfassung: Ziel der diesem Übersichtsreferat zugrunde liegenden Untersuchungen war es, einen Beitrag zur Aufklärung der Ursachen für die starken jährlichen Schwankungen bei der Rekrutierung mariner Fischbestände zu leisten. Zur Untersuchung der Frage, ob massenhaftes Verhungern von Fischlarven eine wesentliche Ursache für die Rekrutierungsschwankungen ist, wurde geprüft, ob sich die Trypsinaktivität als Indikator eignet, um den Ernährungszustand und die Futteraufnahme von Fischlarven individuell und in allen Altersstufen darzustellen. Hierzu wurde auf der Basis konventioneller photometrischer Methoden eine hochempfindliche fluoreszenzphotometrische Technik zur Bestimmung der Trypsinaktivität in Fischlarven mit einer im Vergleich zu den bis dahin benutzten Verfahren etwa 100-fach höheren Empfindlichkeit entwickelt. Die Steigerung der Empfindlichkeit war eine wesentliche Voraussetzung, um die für die Fragestellungen erforderliche individuelle Bestimmung der Trypsinaktivität zu ermöglichen. Um artspezifische Unterschiede der Trypsinaktivität herauszufinden, wurden die Larven von sechs verschiedenen marinen Fischarten (Hering, *Clupea harengus*, Steinbutt, *Scophthalmus maximus*, Dorsch, *Gadus morhua*, Wolfsbarsch, *Dicentrarchus labrax*, Goldbrasse, *Sparus aurata*, und brasilianische Sardine, *Sardinella brasiliensis*) aus unterschiedlichen klimatischen Habitaten im Labor unter kontrollierten Bedingungen aufgezogen, ein Teil der Ergebnisse wird hier dargestellt.

Die wichtigsten Ergebnisse aus Laborversuchen lassen sich wie folgt zusammenfassen: Als Bezugsgrößen für die Trypsinaktivität wurden das Larvenalter und die Larvenlänge gewählt. Bereits in der Dottersackphase konnte bei allen Arten eine Trypsinaktivität festgestellt werden. Sie nimmt mit dem Alter bzw. der Larvenlänge nicht gleichmäßig zu, sondern folgt bei kontinuierlich gefütterten Larven einem ontogenetisch vorgegebenen Muster, mit insgesamt deutlich ansteigendem Verlauf bis zum Zeitpunkt der Entwicklung eines funktionsfähigen Magens. Dieses Muster spiegelt sich auch in der Wachstumsgeschwindigkeit wieder. Die Trypsinaktivität hat quantitativ betrachtet eine artspezifische Komponente. Steinbuttlarven zeigen die höchste, Heringslarven die geringste Trypsinaktivität bei vergleichbarem Alter. Der Anteil exogener Trypsinaktivität aus aufgenommener Nahrung spielt bei der Gesamttrypsinaktivität einer Larve eine nur untergeordnete Rolle. Die Trypsinaktivität reagiert sehr differenziert auf eine Veränderung der Futterdichte. Für Herings- und Steinbuttlarven wurde gezeigt, dass nicht nur gefütterte von hungernden Larven unterschieden werden können, sondern auch eine Unterscheidung zwischen gut und schlecht ernährten Larven möglich ist. Die Unterschiede zwischen hungernden und gefütterten Gruppen sind in der Regel signifikant, während die Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Futterdichten nicht in allen Fällen signifikant sind.

Während der Dottersackphase und des Umstellungsprozesses von endogener auf exogene Nahrungsquellen besteht kein Unterschied bei der Trypsinaktivität von bereits mit Futter versorgten und hungernden Larven bei allen untersuchten Arten. Diese Phase kann je nach Art bis zu zehn Tage nach dem Schlupf andauern. Bei hungernden Larven ist die Trypsinkapazität bereits nach einigen Stunden geringer als bei gefütterten Larven, ein signifikanter Unterschied jedoch ist, in Abhängigkeit von der Art, erst nach ein bis drei Tagen zu erkennen. Bei Arten aus den gemäßigten Breiten dauert es länger, bis ein signifikanter Unterschied sichtbar wird. Bei dauerhaftem Futterentzug nähert sich die Trypsinaktivität asymptotisch einem Grenzwert, der in Abhängigkeit vom Alter bzw. der Larvengröße unterschiedlich schnell erreicht wird und im Niveau artenspezifisch ist. Die individuelle Variabilität der Trypsinaktivität ist bei Futtergruppen hoch, sie nimmt bei geringer Nahrungsdichte ab und ist bei Hungergruppen mit zunehmender Hungerdauer kaum noch feststellbar.

Es wurde eine tagesrhythmische Änderung der Trypsinaktivität im Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Fütterung festgestellt. Die Trypsinaktivität steigt nach einer Futterration im Bereich von Stunden deutlich an und fällt ebenso schnell zurück auf das Niveau vor der Fütterung. Dieses basale Trypsinniveau gut ernährter Larven liegt immer deutlich oberhalb des Trypsinaktivitätsniveaus von mehreren Tagen hungernder Larven. Neben der Triggerung der Trypsinausschüttung durch Futteraufnahme wurden Hinweise auf einen tageszeitabhängigen endogenen Rhythmus gefunden. Hungernde Larven zeigen keine bedeutende Änderung der Trypsinaktivität im Tagesverlauf.

Für die Abschätzung hungernder Fischlarven in Feldproben wurde die Laborkalibrierung für hungernde Larven der entsprechenden Art in Beziehung zur Larvenlänge gesetzt und an eine Regressionsgerade angepasst. Der obere 95%-Vorhersagebereich der Regression wurde als Grenzwert zur Beurteilung des Ernährungszustandes definiert. Die Larvenlänge wurde als Bezugspunkt verwendet, weil sie durch Futterentzug kaum beeinflusst wird und sich im Gegensatz zum Alter bei Fischlarven aus Feldproben leicht bestimmen lässt.

Aufgrund der artspezifischen Ausprägung der Trypsinaktivität lassen sich Laborkalibrierungen für die Feldanwendung prinzipiell nur auf die Arten anwenden, für die eine solche Kalibrierung durchgeführt wurde. Die Anwendbarkeit der Kalibrierung innerhalb nahe verwandter Arten (z.B. Clupeidae) wird jedoch als zulässig eingeschätzt.

Aus den Ergebnissen der verschiedenen Laborexperimente mit Steinbuttlarven wurde abgeleitet, dass die Bestimmung der Trypsinaktivität zu einer Optimierung der Futterration und Fütterungszeit in der Aquakultur beitragen kann.

In zum Teil exemplarischen Feldstudien zur Trypsinaktivität von Fischlarven aus Feldproben wurde gezeigt, wie der Ernährungszustand bei verschiedenen Arten (Hering, Dorsch, Sprotte) untersucht und bewertet werden kann.

Die wichtigsten Ergebnisse aus den Felduntersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen: Es wurde der Ernährungszustand bei Heringslarven aus unterschiedlichen Laichgebieten (Hebriden-Orkney-Shetland-Gebiet und Ärmelkanal) auf der Basis der Laborkalibrierung für den Hering miteinander verglichen. Im Hebriden-Orkney-Shetland-Gebiet wurden auf verschiedenen Stationen zwischen 0 und 80% hungernde Larven festgestellt, wobei hier nur Larven unter 10 mm betroffen waren. Im Ärmelkanal wurden etwa 28% der Larven in den Proben als hungernde Larven eingestuft, hiervon waren Larven aller Längenbereiche betroffen. Insgesamt entsprach der Befund weitgehend den zu erwartenden Ernährungsbedingungen in den verschiedenen Gebieten zum Zeitpunkt der Untersuchungen.

Für Sprotten werden die Ergebnisse einer umfangreicheren Feldstudie im Rahmen des SARP (Sardine-Anchovy-Recruitment-Program)-Programms vorgestellt. In dieser Studie wurde der Ernährungszustand von Sprottenlarven während einer gesamten Laichsaison von Mai bis August verfolgt und später mit der Abundanz juveniler Sprotten im Untersuchungsgebiet verglichen. Die Bewertung der Trypsinaktivitäten bei den Sprottenlarven erfolgte auf der Basis der Laborkalibrierungen vom Hering, wobei zwischen 53,1% (im Mai) und 6,3% (Juli-August) hungernde Sprottenlarven festgestellt wurden. Hervorgehend aus den Perioden mit den geringsten Anteilen hungernder Larven (Juni und August) wurde die höchste Abundanz von juvenilen Sprotten im Herbst festgestellt. Die während der Larvenperiode festgestellten Zooplanktondichten entsprachen diesen Zusammenhängen.

Für den Dorsch wurden einige Feldproben exemplarisch ausgewertet. Hierzu standen Laborkalibrierungen der jeweiligen Art zur Verfügung. In diesen Feldproben wurden ebenfalls hungernde Larven ermittelt (30.8% von 5-9 mm langen Dorschlarven), es waren auch größere Larven betroffen.

Untersuchungen über die Tagesrhythmik der Trypsinaktivität in Feldproben von Driftstationen zeigen bei Sardinenlarven (*Sardina pilchardus*) einen regelmäßigen Tag-Nacht-Rhythmus, der aufgrund der Laborexperimente mit der Fressaktivität in Verbindung gebracht werden konnte. Geringe Trypsinaktivitäten wurden in den Nachmittags- bis frühen Abendstunden gefunden, hohe Trypsinaktivitäten wurden zwischen Mitternacht und der Morgendämmerung gemessen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse aus den Felduntersuchungen, dass Verhungern eine große Bedeutung für die Gesamtmortalität von Fischlarven haben kann.

Schlüsselworte: Fischlarven, Aufzucht, Verdauungsenzyme, Trypsin, Pepsin, Rekrutierungsproblematik, Fluoreszenzmessung, kritische Zeiten, Verhungerungshypothese, Schwimmblase

Summary: The studies which form the background for this synoptic presentation aimed to contribute to the investigation of the reason for great yearly fluctuations in recruitment in marine fish stocks. In order to evaluate if mass mortality due to starvation in the larval stage contributes to these fluctuations, trypsin activity was suggested as an appropriate indicator to assess individually both the nutritional condition and feeding activity of fish larvae of all age stages. Based on the principle of conventional chromogenic methods a highly sensitive fluorometric measurement was developed, which allows the individual assessment of tryptic activity even in the youngest larval stages. In order to evaluate species-specific features of tryptic activity, larvae of six different marine species were reared under laboratory conditions (herring, *Clupea harengus*, turbot, *Scophthalmus maximus*, cod, *Gadus morhua*, sea bass, *Dicentrarchus labrax*, gilthead seabream, *Sparus aurata*, and Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis*). The exemplary application of the laboratory calibration in field surveys clearly demonstrates that the tryptic activity is appropriate to evaluate the nutritional condition of larvae from field samples. Examples for some species are presented (herring, cod and sprat).

The most significant results from laboratory experiments: Larval age and larval size were chosen as the standard for comparison to relate to tryptic activity. Tryptic activity was found even in yolk sac stages of the investigated species. Tryptic activity increases with age in continuously fed larvae following a non-linear pattern which is supposed to be determined in the ontogenetic development of each species. Increase in tryptic activity persists until larvae develop a functional stomach. The amount of maximum tryptic activity at a given size and age is species specific: turbot larvae show the highest whereas herring larvae have the lowest values at a given age. The amount of trypsin which has its origin in the ingested food organism is of minor significance for the measurement. Tryptic activity reacts very sensitive on variations in food density. Not only fed and starved larvae can be separated but also larvae kept at high and low food concentration. Differences in tryptic activity between fed and starved larvae are statistically significant in the majority of the investigated species, but differences in larvae kept at high and low food densities are not always significant.

In yolk sac stages and beyond, while adapting to exogenic food sources, differences in tryptic activity are insignificant in larvae with and without food supply. This stage can last until ten days after hatching, depending from the species. When relying completely on external food sources, differences in tryptic activity occurs within hours when fed and starving larvae are compared. However, significant differences arise only after 1- 3 days, depending on species, size and age. Species with their origin in temperate latitudes shows a slower decrease in tryptic activity compared to species from subtropical or tropical areas. If food deprivation persists, tryptic activity levels off to zero within days; the number of days is depending from the species, age and size. Individual variability of tryptic activity is large in continuously fed larvae, moderate in larvae kept on low food density and disappears in starving larvae.

A diurnal rhythm in tryptic activity was identified. In addition, tryptic activity increases as a consequence of active feeding and decreases thereafter within hours to the pre-feeding level; however, those level is always well above the tryptic activity level of starving larvae. Starving larvae show a very weak diurnal oscillation in tryptic activity.

Laboratory calibration was used to estimate the number of starving larvae in field samples. For this purpose, tryptic activity was related to the larval size and the values for starving larvae were fitted to a linear regression. The upper 99% prediction limit of the regression analyses fitted to starving larvae was used as threshold value to assess the nutritional condition of field samples. Larval length was chosen as reference value for tryptic activity, since tryptic activity rather depends on the developmental stage (size) than on larval age; further it is easy to measure the length in larvae from field samples and moreover, the length is not much affected when larvae are in a bad condition (compared to larval weight or protein content).

Ideally, the species from field surveys should have a calibration background under laboratory conditions; however the application of laboratory results appears to be valid within the same taxa (e.g. Clupeidae). An example is given in this presentation.

Results from experiments with turbot larvae indicate that tryptic activity measurements can be used to optimize the food ration and the time of feeding in growing larvae in aquaculture.

The exemplary application of the laboratory calibration in field surveys clearly demonstrates, the tryptic activity is appropriate to evaluate the nutritional condition of larvae from field samples. Examples for some species are presented (herring, cod and sprat).

The most significant results from field studies: Nutritional condition of herring larvae from two different, but typical spawning locations (Hebrides-Orkney-Shetland in autumn season, English Channel in January) were evaluated and compared. Starving larvae in the range of 0-80% were found for the autumn spawners, however only small larvae around 10mm were concerned; about 27% of the larvae caught in the English Channel were rated as starving larvae, but larvae of all sizes were concerned. The results are in accordance with the usually expected environmental conditions in those areas (food availability and hydrographic conditions).

In the context of a large scale study on sprat recruitment (*Sprattus sprattus*) in the North Sea (SARP, Sardine-Anchovy-Recruitment-Program), a survey on the condition of sprat larvae throughout the whole spawning season was conducted (sprat are batch spawners). The tryptic activity of sprat larvae were assessed from May to August and compared to the abundance of juvenile sprat in the related area in autumn of the same year. There was a clear positive relation between the periods with larvae in a fair nutritional condition and the number of juvenile sprat and vice versa. Results on the abundance of food availability in the investigated area confirmed these observations.

Nutritional condition of cod larvae from field samples from the Baltic were rated in accordance with the laboratory calibration. About 30% of starving larvae of all sizes were calculated. The results show, that not only the youngest larval stages are concerned from weak nutritional conditions.

Investigations on the diurnal rhythm of tryptic activity in field samples of sardine larvae showed a clear periodical day and night pattern. Low tryptic activities were measured in samples from afternoon to dusk, whereas high activities were measured in samples from midnight to dawn. In accordance with related laboratory results it can be concluded, that feeding activity is responsible for the clear pattern. Concluding, the results suggest that mortality due to starvation is of significance in marine fish larvae.

Key words: fish larvae, laboratory rearing, digestive enzymes, trypsin, pepsin, fluctuations, recruitment problems, fluorescence measurement, critical times, starvation hypothesis, swim bladder

1. Einleitung

Der Fisch ist schon seit dem Altertum ein bedeutendes Nahrungsmittel für den Menschen. Die ständige Optimierung der Fangtechnik ermöglicht heute Fangerträge von weltweit 90-100 Mio. Tonnen. In jüngerer Zeit ist allerdings deutlich geworden, dass

diese hohen Erträge nicht dauerhaft haltbar und viele bedeutende Fischbestände überfischt sind oder sich bereits in einem kritischen Zustand befinden (FAO 2005). Umso wichtiger sind neue Ansätze, die es erlauben, bereits die Überlebenschancen von Fischlarven und Juvenilen in der Natur beurteilen zu können.