

3 Material und Methodik

3.1 Bestimmung und Verbreitung von Parasiten im Modellbetrieb

Zur Untersuchung des parasitär bedingten Verlustgeschehens war es notwendig, anhand diverser Versuche mit Fischen und Invertebraten den Lebenszyklus des beteiligten Parasiten nachzuvollziehen. Alle folgenden Tierversuche wurden gemäß § 8a, Abs.1 und 2 des Tierschutzgesetzes vor Versuchsdurchführung beim Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten in Potsdam angezeigt.

3.1.1 Orientierende Untersuchung von Fischen des Modellbetriebs

Um einen Überblick über die in der Fischzuchtanlage vorkommenden Parasiten zu erhalten, wurden insgesamt 37 Fische einer parasitologischen Untersuchung zugeführt. Die Tiere wurden sowohl der Becken- als auch der Teichanlage mittels Kescher oder Wurfnetz entnommen. Im Anschluss erfolgte der Transport an das Institut für Binnenfischerei e.V. in Potsdam-Sacrow, wo die Untersuchung der Fische innerhalb weniger Tage erfolgte. Dazu wurden die Tiere mit einem Schlag auf den Kopf betäubt und durch Genickschnitt getötet (AMLACHER 1992; ANONYM 5 1993). Der Probenumfang war artspezifisch und umfasste zwölf Karpfen (*Cyprinus carpio*), zehn Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), drei Schleien (*Tinca tinca*), drei Zander (*Sander lucioperca*) und einen Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*). Neben den Nutzfischarten wurden darüber hinaus die metazoischen Parasiten von sechs Plötzen (*Rutilus rutilus*) und zwei Bleien (*Abramis brama*) bestimmt. Nach der äußeren makroskopischen Begutachtung von Haut und Flossen auf möglichen Parasitenbefall wurden Augen und Kiemen unter Verwendung eines Stereomikroskops auf das Vorhandensein von Schmarotzern untersucht. Im Anschluss wurden Leber, Milz, Magen-Darm-Trakt, Gallenblase, Schwimmblase sowie Nieren und Herz auf das Vorhandensein von Parasiten überprüft. Der Magen-Darm-Trakt wurde in der gesamten Länge aufgeschnitten und die im Lumen befindlichen metazoischen Parasiten erfasst.

Kiemen, Flossen und Muskulatur wurden nach SCHUSTER et al. (1998) künstlich verdaut, um eventuell im Gewebe vorhandene Metazerkarien freizusetzen. Zu diesem Zweck wurden 10-20 g ungehäutetes Filet (zerkleinert in Würfel mit ca. 1 cm Kantenlänge) mit sämtlichen Flossen respektive alle Kiemenbögen des jeweiligen Fisches in zwei separate Bechergläser mit je 50 ml Verdauungslösung, angesetzt aus

0,7 Vol. % Salzsäure (32% ig) und 0,9 Vol. % Pepsin (2000 FIP U/ g), überführt. Sodann wurden die Proben bei Raumtemperatur auf einen Magnetrührer (120 U/ min.) verbracht und nach einem Zeitraum von 90 Minuten über ein Sieb der Maschenweite 250-300 µm abgossen, um vorhandene Gräten und Schuppenreste zu entfernen. Die Bechergläser wurden im Anschluss mit Wasser aufgefüllt, um die Lösung zu verdünnen und den Verlauf der Digestion zu verlangsamen bzw. zu unterbrechen. Nach weiteren 10 Minuten, in denen sich die schwereren Bestandteile inklusive der vorhandenen Trematoden am Boden absetzten, wurde der Überstand vorsichtig abgossen und der Bodensatz in eine Petrischale überführt. Durch vorsichtig kreisende Bewegungen der Schale sammelten sich die Trematoden in der Mitte des Gefäßes. Je nach Trübung wurde Flüssigkeit vom Rand der Schale abpipettiert, bis die Parasiten eindeutig zu identifizieren waren. Bei starker Trübung der Lösung musste nach dem Absaugen gegebenenfalls erneut Wasser zugegeben und der Vorgang wiederholt werden.

Die Artdetermination der Parasiten erfolgte mit Hilfe der Bestimmungsschlüssel von BAUER (1985, 1987).

3.1.2 Morphometrische Daten der Entwicklungsstadien von *B. polymorphus*

Um im Anschluss Versuche zur Erprobung von Bekämpfungsverfahren durchführen zu können, wurde der Lebenszyklus von *B. polymorphus* vollständig in den Anlagen und Laboren des IfB etabliert. Die verschiedenen Entwicklungsstadien des Trematoden wurden sodann morphologisch und morphometrisch beschrieben.

3.1.2.1 Vermessung von *B.- polymorphus*- Eiern

Aus dem Magen-Darm-Trakt künstlich infizierter Zander (siehe 3.1.4) konnten adulte *B. polymorphus* gewonnen werden. Nach Überführung dieser Adulti in Petrischalen mit Leitungswasser wurden *B.- polymorphus*- Eier spontan abgesetzt. Zehn zufällig ausgewählte Eier wurden nativ bei 20- bis 60-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop beschrieben und ihre Länge und Breite vermessen.

3.1.2.2 Vermessung von *B.- polymorphus*- Mirazidien

Bei Eiern, die nach Gewinnung (siehe 3.1.2.1) in Leitungswasser, destilliertes Wasser oder Wasser des Sacrower Sees unterschiedlicher Temperatur verbracht wurden (Tab. 1), sollte der Schlupf der Wimpernlarven beobachtet werden. Im Anschluss er-

folgte eine Beschreibung der ungefärbten Wimpernlarven bei 40- bis 60-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop.

Tab. 1: Anzahl und umgebendes Medium der auf Schlupf von Mirazidien untersuchten Eier

Anzahl Eier	Medium
21	A. dest., Raumtemp.
34	A. dest., Raumtemp.
78	A. dest., Raumtemp.
20	A. dest., Raumtemp.
20	A. dest., 25°C
12	Leitungswasser, 20°C
20	Leitungswasser, 25°C
ca. 200	Wasser d. Sacrower Sees, 17°C

3.1.2.3 Vermessung von *B.- polymorphus*- Sporozysten

Aus 50 zufällig gewählten befallenen Dreikantmuscheln (*D. polymorpha*) aus der betroffenen Fischzuchtanlage wurden durch Sektion Sporozysten gewonnen, die mit Hilfe von Stereolupe und Mikroskop bei 10- bis 60-facher Vergrößerung eingehend untersucht wurden. Die Beschreibung der Präparate erfolgte nativ oder nach vorheriger Färbung mit Neutralrot (BATURO 1977).

3.1.2.4 Vermessung von *B.- polymorphus*- Zerkarien

Die Gewinnung reifer Zerkarien gelang zum einen durch ein spontanes Austreten der Zerkarien aus infizierten Muschelwirten. Die Dreikantmuscheln wurden zu diesem Zwecke unterschiedlichen Licht- und Temperaturregimes ausgesetzt, um den Ausstoß der Zerkarien auszulösen (siehe 3.1.3.1).

Des weiteren konnte durch Nadelpräparation der im Verlauf der Muschelsektionen gewonnenen Sporozysten Zerkarien unterschiedlichen Reifegrades gewonnen werden. Von elf zufällig ausgewählten schlupffreien Zerkarien wurden Körperlänge und –

breite, Länge und Breite der Furca-Ansätze, der Durchmesser der Penetrationsdrüse sowie, wenn möglich, die Länge der Exkretionsblase nativ oder nach Neutralrotfärbung bestimmt.

3.1.2.5 Vermessung von *B. polymorphus*- Metazerkarien

Durch künstliche Verdauung infizierter Fische (siehe 3.1.1) konnten enzystierte und exzystierte Metazerkarien gewonnen und bei 10- bis 40-facher Vergrößerung wie folgend vermessen werden: Bei 50 exzystierten Parasiten wurden Körperlänge und – Breite, Länge und Breite des anterioren Saugnapfes und die Länge der Exkretionsblase ermittelt. Von 31 weiteren Tieren wurden Länge und Breite der umhüllenden Zystenmembran ermittelt.

3.1.2.6 Vermessung von *B. polymorphus*- Adulti

Aus dem Magen-Darm-Trakt künstlich infizierter Zander (siehe 3.1.4) konnten durch Sektion erwachsene *B. polymorphus* unterschiedlichen Alters gewonnen werden, die unter Verwendung von Stereolupe und Mikroskop beschrieben wurden.

3.1.3 Untersuchungen von Mollusken als potenzielle erste Zwischenwirte

3.1.3.1 Untersuchungen zum Vorkommen von *B. polymorphus* in der Dreikantmuschel (*D. polymorpha*)

Die Teiche, Rundbecken und Zuläufe der betroffenen Fischzuchtanlage wurden im Rahmen mehrerer Begehungen auf das Vorhandensein von Mollusken untersucht, da diese als potenzielle Zwischenwirte für Trematoden fungieren und gegebenenfalls zur Ausbreitung von Erregern innerhalb der Anlage beitragen können. Es wurde schnell deutlich, dass neben vereinzelt anzutreffenden Wasserschnecken wie *Lymnaea*- und *Radix*- Arten insbesondere *D. polymorpha* sehr starke Populationen bildet. Aus verschiedenen Verteilerstationen des Rohrleitungssystems zur Wasserversorgung der Beckenanlagen wurden mittels eines Keschers mehrere Tausend Muscheln (Gesamtmasse ca. 120 kg) geborgen. Die Dreikantmuscheln wurden nach der Verbringung an das Institut für Binnenfischerei e.V. in ein 1300- Liter- Plastikrundbecken aus glasfaserverstärktem Polyester (GFP) überführt und dort gleichmäßig am Boden verteilt. Das Becken wurde kontinuierlich über eine Pumpe mit Wasser des Sacrower Sees versorgt. Die durch den Pumpenbetrieb erzeugte Wasserströmung

(gemessen am Außenrand des Beckens) betrug 5-8 cm/ s; die Wassertemperatur schwankte im Untersuchungszeitraum zwischen 13 und 27 °C. Das Ablaufwasser wurde über ein System von Rohrleitungen und Wasserstürzen geleitet und nach Passage eines Plastikbeckens in den Sacrower See entlassen.

Zur Untersuchung eines möglichen Befalls der überführten Dreikantmuscheln mit Sporozysten des Trematoden *B. polymorphus* wurden insgesamt 132 Mollusken einzeln auf mit ca. 10-15 ml Leitungswasser gefüllte Bechergläser verteilt. Entsprechend den Empfehlungen von GRACZYK & FRIED (2001) wurde durch Änderungen des Licht- und Temperaturregimes versucht, befallene Muscheln zum Ausstoß von Zerkarien zu veranlassen. Zu diesem Zweck wurden Dreikantmuscheln in verschiedenen Experimenten für eine unterschiedliche Zeitspanne abgedunkelt und/ oder direkt einer Lichtquelle (60-W-Glühbirne / 80-W-UV-Lampe / direkte Sonnen-Einstrahlung) ausgesetzt. Wechselnde Temperaturregimes wurden durch die Verwendung eines Brutschrankes (24 °C) bzw. schnelle Erwärmung der geringen Wasservolumina der Bechergläser durch direkte Sonneneinstrahlung ermöglicht. Die genauen Versuchsbedingungen in den einzelnen Experimenten sind in Tab. 2 wiedergegeben.

Tab. 2: Testbedingungen und Anzahl der in den jeweiligen Versuchen verwendeten Dreikantmuscheln (*D. polymorpha*)

Versuch Nr.	Testbedingungen	Anzahl der Muscheln
1	24-stündiger Aufenthalt bei Zimmertemperatur (22 °C) und natürlichem Licht	35
2	3-stündiger Aufenthalt bei Zimmertemperatur (22 °C) und Kunstlicht (60 W)	15
3	24-stündiger Aufenthalt bei 15 °C und Dunkelheit, anschließend 3-stündiger Verbleib im direkten Sonnenlicht	15
4	48-stündiger Aufenthalt bei Zimmertemperatur (22 °C) und Dunkelheit, anschließender Verbleib im direkten Sonnenlicht für 45 Minuten	15
5	24-stündiger Aufenthalt bei Zimmertemperatur (22 °C) und Dunkelheit, anschließende Exposition gegen Kunstlicht (3 Std., 60 W), nachfolgend Verbleib im direkten Sonnenlicht für 35 Minuten	13
6	halbstündiger Aufenthalt bei Zimmertemperatur (22 °C) und UV-Kunstlicht	13
7	2-stündiger Aufenthalt bei Zimmertemperatur (22 °C) und UV-Kunstlicht	26

Das in den Bechergläsern befindliche Wasser wurde in unregelmäßigen zeitlichen Abständen mit Hilfe eines Stereomikroskops auf ausgetretene Zerkarien untersucht. Um die genaue Anzahl der Negativ- bzw. Positivbefunde zu erhalten und die Sensitivität der jeweils verwendeten Methode zu ermitteln, wurden sämtliche Mollusken nach Abschluss der Untersuchungen sezirt. Darüber hinaus erfolgten im April und Juli 2003 die Sektion und parasitologische Untersuchung von 405 weiteren Dreikantmuscheln.

Die Artbestimmung der Zerkarien erfolgte anhand der Werke von BATURO (1980) und TASKINEN et al. (1991).

3.1.3.2 Untersuchungen zum Bestehen einer mehrjährigen *B.- polymorphus*-Infektion der Dreikantmuschel (*D. polymorpha*)

Um die Frage zu klären, ob Sporozysten von *B. polymorphus* unter den gegebenen Bedingungen zur Überwinterung in der Dreikantmuschel fähig sind, wurde im November 2002 eine Waschtrommel mit ca. 2 kg lebenden Dreikantmuscheln, welche aus der betroffenen Anlage stammten, in den Sacrower See gesenkt und in drei Meter Wassertiefe vertäut. Nachdem der See im Frühjahr 2003 eisfrei war, wurde die Waschtrommel geborgen und 99 der enthaltenen vitalen Muscheln durch Sektion auf eine bestehende Infektion mit *B. polymorphus* untersucht.

3.1.4 Infektion von Zandern (*Sander lucioperca*) mit *B. polymorphus*

Zur Gewinnung adulter *B. polymorphus* wurden 15 zweisömmerige Zander in eine Kreislaufanlage, bestehend aus einem 250-l-Aquarium, einem Absetz- und einem Nitrifikationsbehälter, überführt. Die Fische mit einer anfänglichen mittleren Körperlänge von 13,8 cm und einer durchschnittlichen Körpermasse von 100 g wurden am IfB mit Trockenmischfuttermitteln aufgezogen und waren entsprechend dieser bisherigen Ernährung vor Versuchsbeginn frei von *B.- polymorphus*-Infektionen. Nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase wurden sie schrittweise an die Aufnahme von frischem Fisch adaptiert. Nachfolgend wurden an die Zander ausschließlich *B.- polymorphus*-infizierte Weißfische verfüttert. Drei Monate nach der erstmaligen Verfütterung von durch Stichprobenuntersuchungen nachweislich infiziertem Material wurde mit der Sektion der Fische begonnen. Dazu wurden die Zander mit einem Schlag auf den Kopf betäubt, der Genickschnitt durchgeführt und anschließend die Bauchhöhle geöffnet (AMLACHER 1992; ANONYM 5 1993). Unter einer Stereolupe wurde bei 20-40facher Vergrößerung der Magen-Darm-Trakt in seiner gesamten Länge aufgeschnitten, die vorhandenen Trematoden entnommen und in Leitungswasser gesäubert. Die nachfolgende Artbestimmung der adulten Parasiten erfolgte unter Verwendung eines Mikroskops und des Bestimmungsschlüssels nach BAUER (1987). Die adulten Trematoden wurden im Anschluss in 200 ml-Zellkulturflaschen (Fa. NUNC A/S; Dänemark, Cat.# 147 589) mit jeweils 100 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (Fa. GIBCO, Cat.# 22320-022, enthält zusätzlich Pyridoxin, Natrium-Pyruvat und 1000 mg/l Glukose) überführt und im Kühlschrank für die weitere Verwendung gelagert. Zusätzlich wurde den Zellkulturflaschen jeweils 0,1 ml Amphoterizin B (Fa. GIBCO, Cat.# 15290-018) und 0,1 ml Gentamicin (Fa. GIBCO, Cat.#

13750-037) zur Unterdrückung unerwünschter bakterieller und mykotischer Besiedlung zugesetzt.

3.1.5 Infektion von Flussbarschen (*Perca fluviatilis*) mit *B. polymorphus*

Um zu überprüfen, ob neben dem Zander auch der Flussbarsch von *B. polymorphus* als Endwirt genutzt werden kann, wurden drei Barsche mit einer Körpermasse von 123, 133 und 267 g und, als Kontrollgruppe, 5 Zander mit einer Körpermasse von 105 bis 156 g in eine Kreislaufanlage, bestehend aus einem 250-l-Aquarium, einem Absetz- und einem Nitrifikationsbehälter, überführt. Alle Fische waren zum Versuchsbeginn gemäß einer Stichprobenuntersuchung frei von *B.- polymorphus*-Infektionen. Nach einer einwöchigen Adaptationsphase wurden die Fische an 7 aufeinanderfolgenden Tagen mit insgesamt 230 Gramm Kiemen und ungehäutetem Filet nachweislich befallener Weißfische gefüttert. Die Aufnahme des infizierten Materials konnte bei allen Versuchsfischen wiederholt beobachtet werden. Nach einer dreiwöchigen Ruhephase wurden alle Raubfische entnommen, mit einem Schlag auf den Kopf betäubt, der Genickschnitt durchgeführt und anschließend die Bauchhöhle geöffnet (AMLACHER 1992; ANONYM 5 1993). Unter einer Stereolupe wurde bei 20- bis 40-facher Vergrößerung der Magen-Darm-Trakt in seiner gesamten Länge aufgeschnitten, alle sichtbaren Schmarotzer entnommen und in Leitungswasser gesäubert. Die nachfolgende Artbestimmung angetroffener Parasiten erfolgte unter Verwendung eines Mikroskops und des Bestimmungsschlüssels von BAUER (1987).

3.2 Untersuchungen zur Empfänglichkeit verschiedener Fischarten gegenüber *B.- polymorphus*-Zerkarien

Zur Untersuchung der Empfänglichkeit verschiedener Fischarten gegenüber den Zerkarien von *B. polymorphus* wurden in einem mit ca. 120 kg Dreikantmuscheln besetzten GFP-Rundbecken (siehe 3.1.3.1) zwei Infektionsexperimente durchgeführt. Zur Realisierung des ersten Versuchs wurde im Sommer 2002 nach Unterbindung der Wasserzufuhr der Wasserstand im genannten Becken auf ca. 40 cm abgesenkt; die Wassertemperatur betrug 19° C. Anschließend erfolgte der Besatz des Rundbeckens mit 20 Regenbogenforellen (*O. mykiss*), 20 Flussbarschen (*P. fluviatilis*), 16 Güstern (*A. bjoerkna*) und 8 Plötzen (*R. rutilus*). Die Fische (Flussbarsch, Güster, Plötze) entstammten dem Sacrower See bzw. kamen aus einer nahegelegenen Forellenzuchtanlage. Vorherige exemplarische Untersuchungen hatten ergeben, dass

die Fische aus genannten Lokalitäten frei von *B.- polymorphus*- Infektionen waren. Nach einer Expositionsdauer von vier Stunden wurde von jeder Fischart jeweils die Hälfte der verwendeten Individuen in ein separates, mit der Aufschrift „4h“ gekennzeichnetes Rundbecken überführt. Nach acht Stunden wurden auch die restlichen Tiere dem Versuchsbecken entnommen und in ein anderes, mit „8h“ gekennzeichnetes Rundbecken gesetzt.

Im Sommer 2003 erfolgte die Wiederholung des Experimentes mit 28 Karpfen (*C. carpio*, mittlere Stückmasse 266,1 g) und 11 Regenbogenforellen (mittlere Stückmasse 127,0 g). Da die Wasserparameter während des Versuchszeitraumes nicht optimal waren (Temperatur 26 °C, Sauerstoffgehalt 8,0 mg/ l), wurde dieses Experiment als dynamischer Test durchgeführt, der Wasseraustausch betrug während des Expositionszeitraumes etwa 1200 l/ h. Nach vier Stunden wurden sämtliche Regenbogenforellen sowie 14 Karpfen entnommen und in ein separates und entsprechend markiertes Becken verbracht. Nach einem Zeitraum von acht Stunden wurde der Versuch beendet und die verbliebenen 14 Karpfen ebenfalls in eine gesondert gekennzeichnete Hältereinrichtung überführt.

Die Sektion der Fische beider Experimente begann jeweils vier Wochen p.i., um den in die Fische eingedrungenen Zerkarien Gelegenheit zu geben, ihre Entwicklung zur Metazerkarie abzuschließen. Die Sektion erfolgte nach international üblichen Methoden. Zur qualitativen und quantitativen Analyse des Metazerkarienbefalls wurden je Fisch ca. 10-20 g Filet und Flossen nach der Verdauungsmethode von SCHUSTER et al. (1998) behandelt. Bei der Wiederholung des Experimentes wurden zusätzlich die Kiemen der Fische in einem separaten Arbeitsgang analysiert (siehe 3.1.1). Die nachgewiesenen Metazerkarien wurden gezählt und die Artdetermination mit Hilfe aktueller Bestimmungsschlüssel (BAUER 1987) vorgenommen.

3.3 Entwicklung technologischer Verfahren zur Bekämpfung von *B.- polymorphus*- Zerkarien

3.3.1 Laboruntersuchungen

3.3.1.1 Versuche zur Wirkung eines Wassersturzes

Um den Effekt mechanischer Kräfte auf das Überleben und die Vitalität von *B.- polymorphus*- Zerkarien zu ermitteln, wurden die Parasitenlarven durch freien Fall aus unterschiedlicher Höhe auf eine harte Oberfläche Scher- und Reißkräften variabler Stärke ausgesetzt und anschließend auf morphologische Schädigungen untersucht. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für jeden Versuch wurden zehn Zerkarien durch Sektion von jeweils drei befallenen Dreikantmuscheln gewonnen und mittels einer Pipette in ein mit 50 ml Leitungswasser gefülltes Becherglas gegeben. Die Flüssigkeit wurde anschließend über einen Trichter, welcher an einem Stativ in variabler Höhe über einem Auffangbehälter mit festem, ebenen Boden befestigt war, dekantiert. Der Trichter wurde sodann mit 20 ml Wasser nachgespült, um ein eventuelles Anheften von Zerkarien zu vermeiden. Es erfolgte die vorsichtige Überführung des aufgefangenen Wasservolumens und der darin befindlichen Zerkarien in eine Petrischale. Unter Verwendung einer Stereolupe bzw. eines Mikroskops wurden die Parasitenlarven einzeln begutachtet und dabei einer von drei definierten Gruppen (unverletzt, ein bzw. beide Schwanzanhänge fehlend, getötet) zugeordnet; die Anzahl nicht mehr auffindbarer Parasiten wurde notiert. Jeder Versuch wurde sechsmal wiederholt, so dass je Fallhöhe (36 cm, 90 cm, 150 cm, 200 cm, dreimalig 200 cm) 60 Zerkarien exponiert wurden.

3.3.1.2 Versuche zur Wirkung von Ultraschall

Zur Untersuchung der Wirkung von Ultraschall auf *B.- polymorphus*- Zerkarien wurden diese im Labor mit Hilfe des Ultraschallprozessors UP 200S (Fa. Dr. HIELSCHER GmbH, Deutschland) sowie zweier Sonotroden unterschiedlichen Durchmessers (S14, S40 mit 1,4 bzw. 4 cm² effektiver Oberfläche) in mehreren Versuchen ungepulsten Ultraschallwellen verschiedener Stärke ausgesetzt.

Pro Versuchsdurchgang wurden zehn Zerkarien, die durch Sektion von jeweils drei befallenen Dreikantmuscheln gewonnen wurden, bei Raumtemperatur in ein Becherglas mit 50 ml Leitungswasser überführt. Der an einem Stativ befestigte Ultraschall-

prozessor wurde soweit abgesenkt, dass die installierte Sonotrode genau 1 cm in die zu behandelnde Wassermenge eintauchte. Der resultierende Abstand zwischen dem Boden des Becherglases und der Arbeitsfläche der Sonotrode betrug ebenfalls 1 cm. Das Wasservolumen mit den darin enthaltenen Zerkarien wurde anschließend wie in Tabelle 3 dargestellt behandelt, bevor es vorsichtig in eine Petrischale überführt und die Zerkarien mit Hilfe einer Stereolupe bzw. eines Mikroskops untersucht wurden. Aufgrund ihrer äußeren Merkmale wurden die behandelten Parasiten in eine von vier definierten Gruppen (unverletzt; verletzt und Schwanzanhang/-hänge abgetrennt; getötet; vollständig zerfallen) eingeteilt. Jeder dieser Versuche wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und sechsmal wiederholt, so dass jeweils 60 Zerkarien pro Ultraschallbehandlung Verwendung fanden.

Tab. 3: Versuchparameter der Experimente zur Wirkung von Ultraschall auf *B.- polymorphus*- Zerkarien

Versuch Nr.	Schall-Kopf	eingestellte Leistung am Gerät in %	Beschallungsdauer (s)	Mittlere eingebr. Leistung (W) ¹	Spezifischer Energieeintrag $W_{\text{spez.}}$ (kWh/l) ²
1	S14	100	3	59,6	0,000985
2	S14	60	3	38,9	0,000649
3	S40	100	3	105,7	0,00176
4	S40	60	3	64,9	0,00108
5	S40	35	3	38,8	0,00064
6	S40	20	3	33,6	0,00056
7	S40	100	2	96,8	0,00107
8	S40	100	1	91,5	0,000508

¹ W = nach Abzug der entsprechenden Leerlaufleistung des Gerätes

² $W_{\text{spez.}}$ = eingebrachte Energie (kWh) / Volumen (l)

3.3.1.3 Versuche zur Wirkung von UV-C- Licht

Unter Verwendung des UV- Entkeimers UV 400 (Tetrattec[®]) wurde in Laborversuchen die Wirkung ultravioletter Strahlung auf Zerkarien von *B. polymorphus* eingehender untersucht. Dazu wurden bei Raumtemperatur fünfzehn Zerkarien, welche durch Sektion von jeweils drei befallenen Dreikantmuscheln gewonnen wurden, in eine Petrischale mit 30 ml Leitungswasser pipettiert. Nachfolgend wurde das Gefäß unter eine Stereolupe verbracht und die Anzahl der Kontraktionen der einzelnen Zerkarien pro Minute erfasst. Die UV- Lampe mit einer Leistung von 5 W (effektive UV-C-Strahlung 20%, entspr. 1 W) wurde sodann mittig über den Rand der Petrischale gelegt, so dass der Abstand zur Wasseroberfläche weniger als ein Zentimeter sowie die maximale Entfernung zum Rand der Petrischale 3,5 cm betrug. Die Schichtdicke des Wasservolumens belief sich auf ca. 5 mm. Die Expositionsdauer variierte zwischen 0 und 30 s (Tab. 4). In die Berechnung der einwirkenden Strahlendosis ist der Winkel-faktor (Anteil des aufgrund des Eintrittswinkels reflektierten Lichtes) aufgrund geringer Winkelmaße nicht eingegangen. Im Anschluss an die Bestrahlung wurde nach einem Zeitraum von 45 Minuten die Anzahl der Kontraktionen als Maß der veränderten Vitalität behandelter Zerkarien erneut ermittelt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tab. 4: Expositionsdauer und UV-C- Strahlungsdosis in den jeweiligen Laborversuchen

Gruppe Nr.	Expositionsdauer (s)	UV-C-Dosis (J/ m ²)*
1	Keine Exposition (Kontrolle)	-
2	10	950
3	20	1800
4	30	2850

(* bei Vernachlässigung des Winkelfaktors und Berücksichtigung einer Wasserabsorption von 5 %)

3.3.2 Feldversuche

3.3.2.1 Versuche zur Wirkung von Ultraschall unter Feldbedingungen

Im Rahmen eines Feldversuchs wurden die im Labor untersuchten Bekämpfungsmaßnahmen in der betroffenen Fischzuchtanlage unter naturnahen Bedingungen erprobt.

Der Versuchsaufbau umfasste zwei GFP-Rinnen von 3,8 m Länge und einem eingestellten Hältervolumen von 1,04 m³, die mit 37 (Versuchsgruppe) bzw. 38 (Kontrollgruppe) *B. polymorphus*-freien Karpfen und jeweils 34 Regenbogenforellen besetzt wurden. Die Wasserversorgung beider Rinnen erfolgte während des vierwöchigen Beobachtungszeitraumes im Durchflussverfahren, wobei die Menge des zugeführten Talsperrenwassers 60 l/ min. betrug. Die gemessenen Wasserparameter variierten während der Versuchsdurchführung wie folgt:

Temperatur (°C):	17,1 - 24,1
Sauerstoffgehalt (mg/ l):	4,4 - 7,6
pH-Wert:	8,8 - 9,0
NH ₄ (mg/ l):	0,3 - 0,4
NO ₂ (mg/ l):	0,01 - 0,05

Das zur Versorgung der Versuchsgruppe zugeführte Wasser wurde mit dem Ultraschallgerät UIP 4000 (Fa. Dr. HIELSCHER GmbH, Deutschland) beschallt. Die aufgenommene Leistung des Gerätes betrug 2650 W; die Leerlaufleistung liegt bei ca. 300 W (JÄNICH, Dr. HIELSCHER GmbH, mündl. Mitt.). Die eingebrachte Leistung, welche sich aus der Differenz von aufgenommener und Leerlaufleistung berechnet, betrug somit etwa 2350 W. Der spezifische Energieeintrag $W_{\text{spez.}}$ als Quotient aus eingebrachter Energie (kWh) und Volumen (l) ergab einen Wert von 0,000652 kWh/ l. Die Fische der Kontrollgruppe bekamen unbehandeltes Talsperrenwasser zugeführt. Während der Versuchsdurchführung wurden die Tiere in unregelmäßigen zeitlichen Abständen durch Mitarbeiter der Fischzucht- und Hälterungsanlage mit konventionellem Fischfutter versorgt sowie auftretende Verluste täglich dokumentiert. Der Versuch war auf einen Zeitraum von 34 Tagen angesetzt. Nachfolgend wurden die Fische zum IfB transportiert und nach oben beschriebener Verdauungsmethode auf einen Befall mit *B. polymorphus*-Metazerkarien untersucht.

3.3.2.2 Versuche zur Wirkung von UV-C Licht unter Feldbedingungen

Zeitgleich zu den in der Fischzucht- und Hälterungsanlage durchgeführten Feldversuchen zur Wirkung von Ultraschall auf *B.- polymorphus*- Zerkarien wurde in einer dritten GFP-Rinne der Einfluss ultravioletter Strahlung auf das Überleben und/ oder die Infektiosität der Trematodenlarven untersucht.

Das verwendete Versuchsbecken wurde ebenfalls mit Wasser auf ein Volumen von 1,04 m³ angestaut und mit 37 bzw. 34 *B.- polymorphus*- freien Karpfen und Regenbogenforellen besetzt. Die Wasserzufuhr erfolgte analog zum Ultraschallversuch wiederum mit einem kontinuierlichen Volumenstrom von 60 l/ min.; die Wasserparameter entsprechen den oben gemachten Angaben (siehe 3.3.2.1). Das einströmende Wasser wurde am Beckenzulauf unter Verwendung der UV Bio- Balance 36000- Einheit (Fa. UBBINK, Deutschland) mit ultraviolettem Licht behandelt. Die aufgenommene Leistung betrug ca. 10,8 W; die einwirkende Strahlendosis ergab einen Wert von ca. 58 J/ m² (unter Annahme einer Absorption von 20 % sowie einer Einwirkungszeit von 1,117 s).

Der Versuch zur Wirkung von UV-C- Strahlung auf *B.- polymorphus*- Zerkarien unter Feldbedingungen wurde gleichsam über 34 Tage durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten wiederum die unbehandelten Fische des Ultraschallversuches. Die Tiere wurden während dieses Zeitraumes ebenfalls von Mitarbeitern der Fischzuchtanlage betreut. Nach Beendigung dieses Experiments erfolgte der Transport der Fische an das IfB, um sie mittels künstlicher Verdauung qualitativ und quantitativ auf einen erfolgten Metazerkarienbefall zu untersuchen.

3.4 Statistik

Die Termini Abundanz (Anzahl von Parasiten einer Art je *untersuchtem* Fisch), Befallsintensität (Anzahl von Parasiten einer Art je *infiziertem* Fisch), Befallsdichte (Anzahl von Parasiten einer Art je Maßeinheit) und Prävalenz (Befallsrate, prozentualer Anteil infizierter Fische an der Gesamtzahl der untersuchten Individuen) folgen den Empfehlungen von BUSH et al. (1997). Differenzen der Prävalenz verschiedener Versuchsgruppen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test verglichen. Alle Gruppenvergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, wobei jeweils einzelne Vergleiche der zu untersuchenden (Versuchs-) Gruppen mit einer Kontrollgruppe erfolgten. Die Ermittlung von Vertrauensbereichen erfolgte mit Hilfe der Binominal-Konfidenzintervallschätzung für Theta. Die Zurückweisung der Nullhypothese erfolgte bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$. Als tendenziell signifikant wird ein p von 0,05 bis 0,1 bezeichnet. Die in den Bekämpfungsversuchen erzielten Ergebnisse wurden bei Mortalitätsraten zwischen 100 und 90 % als hocheffektive bzw. bei Raten zwischen 90 und 60 % als akzeptable Behandlungserfolge gewertet. Mortalitätsraten unter 60 % wurden als eingeschränkt effektiv betrachtet.