

Aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten
(Kommissarische Leitung: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Andreas Stolle)
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Anleitung von
Prof. Dr. Dr. M. El-Matbouli

Einfluss von exogenen Faktoren auf die Wirt-Parasit- Interaktion bei der Drehkrankheit der Salmoniden¹

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

vorgelegt von
Yatiemene Hamed Kalamourou Coulibaly
aus Korhogo (Côte d'Ivoire)

München 2007

¹ Die Untersuchungen wurden im Rahmen des Projektes "Resistant Trout" durch die Whirling Disease Foundation und den U.S. Fish and Wildlife Service (USA) gefördert.

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

Dekan: Prof. Dr. Erwin Peter Märtlbauer

Referent: Prof. Dr. Mansour El-Matbouli

Korreferent: Prof. Dr. Kurt Pfister

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

Meiner Familie
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Literatur	3
2.1 <i>Biologische Grundlagen der Myxozoa</i>	3
2.1.1 Taxonomie	3
2.1.2 Morphologie	5
2.1.3 Entwicklungszyklus	7
2.2 <i>Biologie der Tubificiden</i>	11
2.2.1 Taxonomie der Tubificiden	12
2.2.2 Biologie der Tubificiden	14
2.2.3 Wechselwirkung zwischen <i>M. cerebralis</i> und <i>T. tubifex</i>	14
2.3 <i>Die Drehkrankheit</i>	17
2.3.1 Symptome	17
2.3.2 Diagnose	18
2.3.3 Differentialdiagnose	19
2.3.4 Therapie	20
3 Zielsetzung	21
4 Eigene Untersuchungen	22
4.1 <i>Material</i>	22
4.1.1 Oligochaeten	22
4.1.2 Gewinnung der <i>M. cerebralis</i> -Sporen	22
4.1.3 Versuchsbecken	22
4.1.4 Bodengrund	23
4.1.5 Füttermischung für die Tubificiden	23
4.1.6 Die Kontrollbecken	25
4.2 <i>Methoden</i>	27
4.2.1 Gewinnung der <i>M. cerebralis</i> -Sporen	27
4.2.2 Vorbereitung der Tubificiden	27
4.2.3 Infektion der Tubificiden	28
4.2.4 Haltung der Oligochaeten	29

4.2.5 Untersuchung auf Actinosporea-Befall	29
4.2.6 Triactinomyxon-Sporenzählung	30
4.2.7 Untersuchung der Oligochaeten	31
4.2.8 Statistik	31
5 Ergebnisse	32
5.1 Infektionsrate: Histologie und Polymerase-Kettenreaktion	32
5.2 Verlauf der Triactinomyxon Ausscheidung	36
5.3 Sporenausscheidung im Zusammenhang mit der Temperaturschwankung	37
5.4 Sporenausscheidung im Zusammenhang mit dem Bodensubstrat	38
5.5 Sporenausscheidung im Zusammenhang mit der Fütterung	40
5.6 Reproduktion und Wachstum der Oligochaeten	41
6 Diskussion	43
7 Zusammenfassung	49
8 Summary	51
Literaturverzeichnis	53
Anhang	69
Abkürzungsverzeichnis	76
Danksagung	78
Lebenslauf	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer <i>M. cerebralis</i> -Spore nach EL-MATBOULI (1996)	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer reifen, entfalteten Triactinomyxon-Spore nach EL-MATBOULI (1998)	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von <i>M. cerebralis</i> im Oligochaeten-wirt nach EL-MATBOULI (1998)	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von <i>M. cerebralis</i> im Fischwirt nach EL-MATBOULI (1998)	11
Abbildung 5: Morphologische Erkennungsmerkmale von <i>T. tubifex</i> nach SAUTER (1995)	13
Abbildung 6: Aufnahme der Versuchsbecken	23
Abbildung 7: Oligochaeten vor der Infektion mit <i>M. cerebralis</i> Sporen	28
Abbildung 8: Beispiel eines PCR-Ergebnisses der untersuchten Oligochaeten aus dem Becken 5A und 5B 60 Tage post expositionem.	35
Abbildung 9: Verlauf der TAM-Produktion während des gesamten Versuchs	36
Abbildung 10: Gesamte Sporenproduktion aller Becken und Temperaturverlauf	37
Abbildung 11: Sporenausscheidung von infizierten Tubificiden in Sand, Schlamm sowie Gemisch Sand und Schlamm	38
Abbildung 12: Gesamte TAMs in den Becken mit Sand, Schlamm sowie Gemisch aus Sand und Schlamm bereinigt von der Temperatur.	39
Abbildung 13: Produzierte Triactinomyxonsporen in den Becken mit verschiedenen Futtern	40
Abbildung 14: Gesamte TAMs in den Becken mit unterschiedlichen Futtern bereinigt von der Temperatur	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Stellung von <i>M. cerebralis</i> in der systemischen Einteilung der Myxozoa nach LEVINE et al. 1980, LOM und NOBLE 1984 und LOM und DYKOVÁ 1992. _____	4
Tabelle 2: Die Stellung von <i>T. tubifex</i> in der systemischen Einteilung der Anneliden nach BRINKHURTS und JAMIESON (1972), geändert von JAMIESON (1978). _____	13
Tabelle 3: Aufstellung der Versuchsbecken für den Substrat (Fütterung: Algae Wafers) _____	25
Tabelle 4: Aufstellung der Versuchsbecken für die Fütterung (Bodengrund: Sand und Schlamm). _____	26
Tabelle 5: Aufstellung der Versuchsbecken für die Kontrolle (Futter: Algae Wafers) _____	26
Tabelle 6: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Oligochaeten 60 Tage nach der Infektion mit <i>M. cerebralis</i> . _____	33
Tabelle 7: PCR-Ergebnisse der untersuchten Oligochaeten 60 Tage post expositionem _____	34
Tabelle 8: Prozentuale Infektionsrate nach PCR-Test _____	35
Tabelle 9: Vergleich Oligochaeten-Anzahl vor und nach dem Versuch, Eierproduktion (Kokons) und Endgewicht vor und nach dem Versuch. Beurteilung bei der Eierproduktion: (-) keine; (++) mittelgradig; (+++) hochgradig _____	42

1 Einleitung

Die Drehkrankheit, eine durch *Myxobolus cerebralis* hervorgerufene parasitäre Erkrankung von Salmoniden, hat sich seit den 50er Jahren unter anderen in den USA sowohl zu einem wirtschaftlichen als auch zu einem ökologischen Problem entwickelt. Im Jahr 1903 erstmals von Hofer beschrieben (HOFER 1903), zählt der Parasit zum Stamm der Myxozoa (GRASSÉ 1970). Seine heteroxene Entwicklung erfolgt obligat in einem Fisch und einem Oligochaet als Wirt (MARKIW und WOLF, 1983). Obwohl verschiedene Salmonidenarten empfänglich sind (EL-MATBOULI et al. 2002), ist die aus den USA stammende Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) am schwersten betroffen. *M. cerebralis* befällt dabei das Knorpelgewebe des noch nicht verknöcherten Skeletts jüngerer Fische. Durch die dort stattfindende massive Vermehrung von Entwicklungsstadien kommt es zu einer Auflösung der Knorpelstruktur und zur Störung der Ossifikation, deren Folge eine Deformation am gesamten Skelett ist (HOFFMAN et al. 1962). Die Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartien, und das für die Erkrankung Namen gebende schnelle horizontale Drehen um eine senkrechte Achse sind weitere Symptome (SCHÄPERCLAUS 1990; ROSE et al. 2000). Während die Schäden in den Fischzuchten durch Optimierung der Haltungsbedingungen noch im Rahmen gehalten werden konnten, kam es in den großen Flüssen zu einer starken Dezimierung der dort heimischen Regenbogenforellen (HEDRICK et al. 1998; WALKER und NEHRING 1995; NICKUM 1999; VINCENT 1996). Die Erkrankung bei Wildpopulationen resultiert aus komplexen Wechselwirkungen zum einen zwischen dem Parasit und seinen beiden Wirten, zum anderen zwischen dem Parasit und seiner Umwelt und sowie zwischen den Wirten und ihrer Umwelt (HEDRICK et al. 1988). Diese Wechselwirkungen sind komplexer, wenn sie in unterschiedlichen geographischen Regionen variieren und mehr als ein Wirt im Lebenszyklus beteiligt ist.

Der ubiquitär vorkommende Oligochaet *Tubifex tubifex* (Annelida, Ringelwürmer) ist als einzige Spezies empfänglich für den Parasiten. Zwischen den Darmepithelzellen der Oligochaeten entwickeln sich die oral aufgenommenen Stadien nach circa drei Monaten zu den für den Fisch infektiösen Triactinomyxon-Sporen (WOLF und MARKIW 1984; WOLF et al. 1986; EL-MATBOULI und HOFFMANN 1989). Schlamm von stehenden, sowie fließenden und auch stark verschmutzten Gewässern bildet den Lebensraum von *T. tubifex*. Aufgrund seiner Widerstandsfähigkeit gegen extreme Umweltbedingungen, wie Sauerstoffmangel, stellt er einen hervorragenden Bioindikator dar.

Zur Erforschung der Drehkrankheit ist es wichtig, den Entwicklungszyklus des Parasiten im

Labor aufrechtzuerhalten. Deswegen ist eine Optimierung von Infektion und Haltung der Oligochaeten erforderlich. Man weiß bis heute noch wenig über die Umweltfaktoren, welche die Infektionsdynamik unter den Tubificiden beeinflussen, außer dass die optimale Temperatur für die Sporenentwicklung bei 15 °C liegt (EL-MATBOULI et al. 1999). BLAZER et al. (2003) untersuchten geeignete Substrattypen für Oligochaeten aus dem Osten der USA und fanden heraus, dass Schlamm der bevorzugte Bodengrund neben Sand und Laubstreu ist.

Es liegen jedoch zurzeit keine ausreichenden wissenschaftlichen Erkenntnisse über geeignete Futterzusammensetzungen und Substrat für die erfolgreiche Haltung der Tubificiden unter Laborbedingungen vor.

In der vorliegenden Dissertationsschrift wird daher der Einfluss der Fütterung und der Substratbeschaffenheit des Bodens auf die Interaktion zwischen *M. cerebralis* und *T. tubifex* untersucht. Die Resultate dieser Arbeit könnten zur Erklärung der variierenden Epidemiologie bzw. der lokalen Ausbrüche der Drehkrankheit in diversen Habitaten beitragen. Des Weiteren sind die gewonnenen Erkenntnisse für die Etablierung bzw. Optimierung des Entwicklungszyklus im Labor von großer Bedeutung.

2 Literatur

2.1 Biologische Grundlagen der Myxozoa

2.1.1 Taxonomie

Der Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden, *M. cerebralis*, ist ein Vertreter des Stammes Myxozoa (GRASSÉ 1970). Dieser umfasst circa 1.350 Arten, die sich in 52 Genera gliedern (LOM und DYKOVÁ, 1995). Er wurde zunächst durch die International Commission on Protozoan Nomenclature in die zwei Klassen Myxosporea, Bütschli (1881) und Actinosporea, Noble (1980) (Tabelle 1) unterteilt (LEVINE et al. 1980). Diese Einteilung konnte jedoch nicht aufrechterhalten werden, nachdem entdeckt wurde, dass die Actinosporea das Entwicklungsstadium einiger Myxosporea-Arten darstellen (KENT et al. 1994). Weiter unklar ist die Zuordnung der Myxosporea zum Unterreich der Protozoa. Da sich Myxosporea-Sporen aus somatischen und generativen Zellen zusammensetzen, fordern einige Autoren, sie den Metazoa zuzuordnen (SMOTHERS et al. 1994; SCHLEGEL et al. 1996; SIDDALL et al. 1995).

Alle Vertreter dieses Stammes sind obligat parasitisch lebende Organismen. Ihre Sporen bestehen aus Schalenzellen, Polkapselzellen mit ausschleuderbarem Polfilament und einem infektiösen Amöboidkeim. Einige wichtige pathogene Vertreter sind neben *M. cerebralis*, *Tetracapsuloides bryosalmonae*, der Erreger der proliferativen Nierenerkrankung der Salmoniden (Proliferative Kidney Disease), *Sphaerospora renicola*, Auslöser der Schwimmblasenentzündung des Karpfens (Swimbladder Inflammation), sowie *Hoferellus carassi*, welcher die infektiöse Nierenvergrößerung beim Goldfisch (Cystic Kidney Enlargement) verursacht. Die Actinosporea parasitieren in aquatischen Oligochaeten und Sipunculiden, sie wurden von MARQUÈS (1984) in 44 Arten und 52 Gattungen unterteilt.

Der Entwicklungszyklus von *M. cerebralis* war lange Zeit unklar. Zunächst wurde ein direkter Infektionsweg vermutet, aber Infektionsversuche von Fisch zu Fisch scheiterten. MARKIW und WOLF (1983) fanden schließlich heraus, dass die Entwicklung des Parasiten zu der für den Fisch infektiösen Form in Tubificiden (*Tubifex tubifex* Müller 1774) erfolgt. Laut dieser Entdeckung existieren also zwei Arten von Sporen: Die Actinospore als die für den Fisch infektiöse Form, und die Myxospore als die für den Tubificiden infektiöse Form. EL-MATBOULI und HOFFMANN (1989) bestätigten, dass der Oligochaet *Tubifex tubifex* als zweiter Wirt für die Entwicklung von *M. cerebralis* notwendig ist.

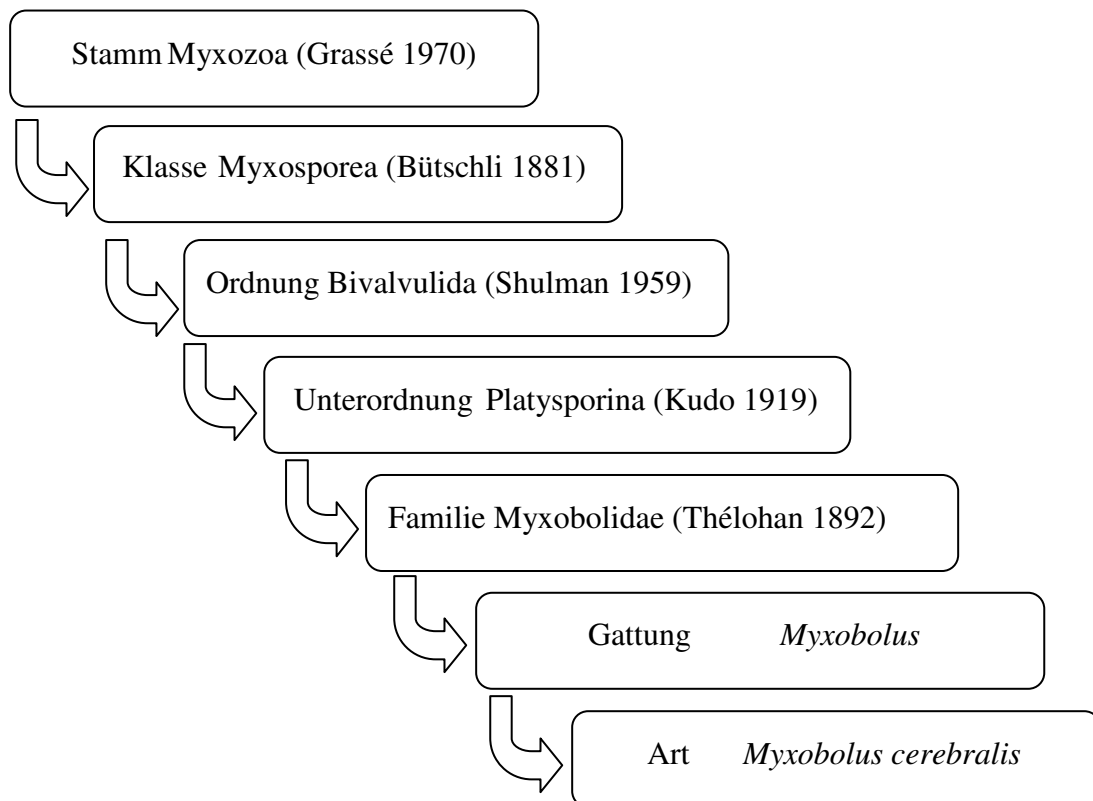


Tabelle 1: Die Stellung von *M. cerebralis* in der systemischen Einteilung der Myxozoa nach LEVINE et al. 1980, LOM und NOBLE 1984 und LOM und DYKOVÁ 1992.

2.1.2 Morphologie

Die *M. cerebralis*-Spore (Abbildung 1) ist in der Frontalsicht rund-oval und besteht aus zwei Schalenzellen, die eine äußere Hülle bilden, zwei Polkapselzellen, in denen sich in fünf bis sechs Windungen aufspiralisierte Polfilamente befinden, und einem zweikernigen Amöboidkeim (LOM und HOFFMAN 1971). Im Durchschnitt ist sie 8,7 µm lang, 8,2 µm breit und 6,3 µm dick. Die Sporen sind äußerst widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen. Sie bleiben bis zu dreißig Jahre infektiös (HOFFMAN und PUTZ 1969) und werden weder von niedrigen Temperaturen bis -20 °C noch von Hitze bis +66°C beeinträchtigt (HOFFMAN 1977; WOLF und MARKIW 1982). Die Sporen können den Verdauungstrakt von Hecht (*Esox lucius*) und Stockente (*Anas platyrhynchos*) intakt passieren (EL-MATBOULI und HOFFMANN, 1991).

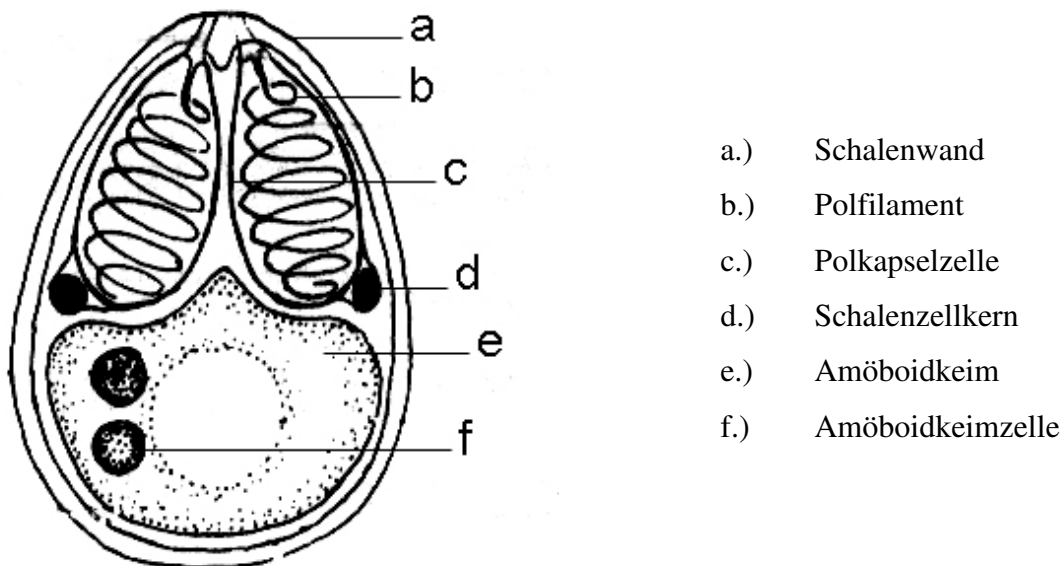
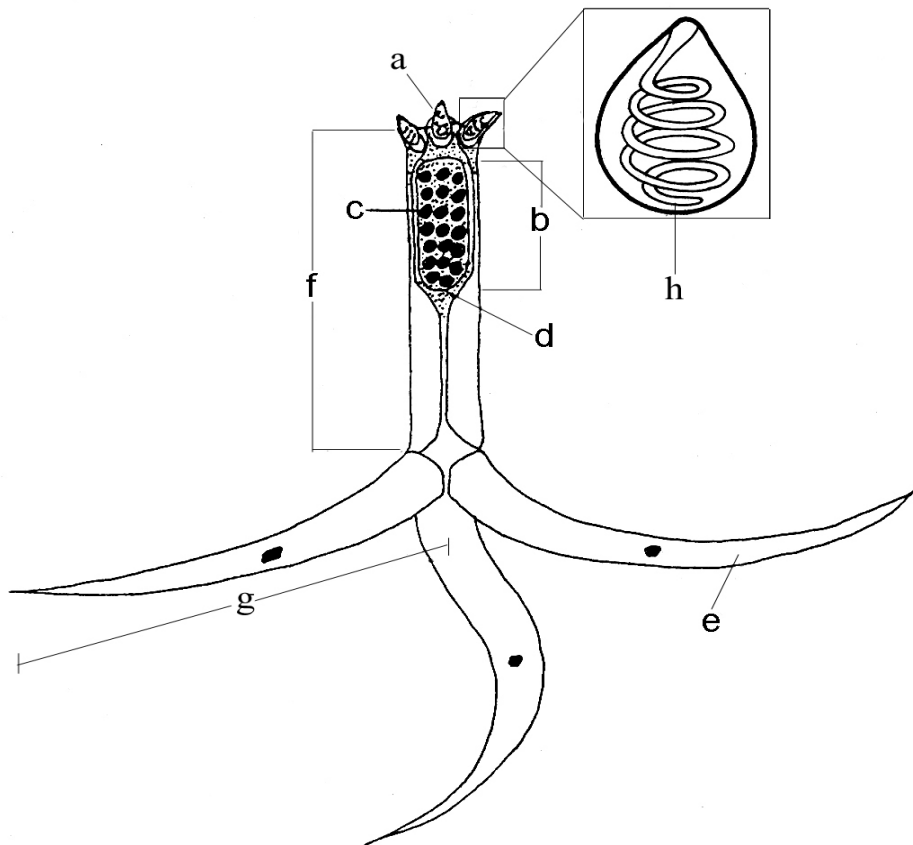


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer *M. cerebralis*-Spore nach EL-MATBOULI (1996)

Die Triactinomyxon-Spore (Abbildung 2) besitzt drei durchschnittlich 193,2 µm lange, ankerförmige Schwebefortsätze und einen etwa 146,7 µm langen Stielfortsatz, in dem sich der bewegliche Amöboidkeim befindet und an dessen Ende die drei Polkapseln sitzen. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen *M. cerebralis*-Spore ist die Triactinomyxon-Spore sehr empfindlich und wenig widerstandsfähig. Ihre Überlebenszeit im Wasser beträgt durchschnittlich nur sieben Tage (HEDRICK et al. 1998) bei einer Temperatur von + 7 °C und ist noch geringer bei höheren Wassertemperaturen (MARKIW 1992).



- a.) Polkapsel
- b.) Sporoplasma (=Amöboidkeim)
- c.) Amöboidkeimzelle
- d.) Sporoplasma-umhüllende Zelle
- e.) Fortsatz
- f.) Stiel
- g.) Länge des Fortsatzes
- h.) Polfilament

Abbildung 2: Schematische Darstellung einer reifen, entfalteten Triactinomyxon-Spore nach EL-MATBOULI (1998)

2.1.3 Entwicklungszyklus

2.1.3.1 Entwicklung im Oligochaeten

Während der Entwicklung bilden sich zwei sporogene Phasen. Da im Oligochaeten *Tubifex tubifex* die Reduktionsteilung und die Gametenfusion stattfinden ist er Endwirt, während die Salmoniden als Zwischenwirte anzusehen sind (EL-MATBOULI und HOFFMANN 1998). Nach dem Tod der infizierten Fische werden durch Verwesung oder Passage des Verdauungstraktes von Raubfischen oder Vögeln die reifen Sporen freigesetzt (EL-MATBOULI et al. 1992). Diese werden für ihre weitere Entwicklung durch die Tubificiden mit der Nahrung aufgenommen (WOLF et al. 1986; EL-MATBOULI und HOFFMANN 1989) und gelangen in das Darmlumen. Dort schleudern die Sporen ihre Polfilamente aus und heften sich an die Darmepithelzellen (EL-MATBOULI und HOFFMANN 1998). Die Schalenzellen öffnen sich entlang einer Nahtlinie und entlassen den zweikernigen Amöboidkeim zwischen den Darmepithelzellen (1)², wo er eine dreiphasige Entwicklung mit **Schizogonie, Gametogonie und Sporogonie** durchläuft (Abbildung 3).

Während der **Schizogonie** kommt es zu einer vegetativen Vermehrung. Dabei durchlaufen die beiden Kerne des Amöboidkeims zahlreiche Teilungen und es entstehen vielkernige Zellen (2). Diese teilen sich wiederum in viele einkernige Zellen (Einzell-Stadium) (3), die anschließend zwischen die Darmepithelzellen einwandern. Durch die so genannte **Plasmogonie** entstehen dann aus jeweils zwei einkernigen Zellen zweikernige Zellen (4), die ab dem 25. Tag nach der Infektion zwischen den Darmepithelzellen nachweisbar sind (EL-MATBOULI 1996). In der Gametogonie bilden sich aus den zweikernigen Zellen durch Teilung vierkernige Stadien (5).

Je zwei dieser Zellen umschließen die beiden verbliebenen (6) und nach weiteren Teilungen entstehen 60-120 Tage nach der Infektion vierzellige Pansporozysten. Diese bestehen aus zwei äußeren somatischen Hüllzellen und zwei inneren generativen Zellen (7). Die beiden inneren generativen Zellen aufgrund unterschiedlicher Genome als α - und β -Zellen bezeichnet vollziehen drei mitotische Teilungen, die Hüllzellen jeweils zwei. Es entstehen 16 diploide Zellen (je 8 α - und β -Gameten), die von acht Hüllzellen umgeben werden (8). Die sechzehn diploiden Gameten durchlaufen eine Reduktionsteilung, woraus sechzehn haploide Gameten (8 α - und β -Gameten) und sechzehn Polkörper entstehen (9). Je ein α - und ein β -Gamet

² Die Nummern 1 bis 13 beziehen sich auf die Abbildung 3

verschmelzen und bilden je eine Zygote (**Gametogonie**). Somit enthält die Pansporozyste nun acht diploide Zygoten (10). Jede Zygote teilt sich zweimal mitotisch (Beginn der **Sporogonie**) und es entstehen vier pyramidenförmige Zellstadien (Vierzellstadium), drei periphere und eine zentrale Zelle (Ursprungszelle des Amöboidkeims) (11). Nach einmaliger mitotischer Teilung der drei peripher gelegenen Zellen entstehen drei Polkapselzellen und drei Schalenzellen (12). Die vierte zentrale Zelle durchläuft viele mitotische Teilungen und bildet auf diese Weise den Amöboidkeim (= Sporoplasma) der Actinosporea-Spore. Somit entstehen innerhalb einer jeden Pansporozyste am Ende der Sporogenese acht reife, infektiöse Triactinomyxon-Sporen mit je drei Schalen- und Polkapselzellen und einem Amöboidkeim mit circa 64 diploiden Zellen (EL-MATBOULI et al. 1995) (13). Die reifen Triactinomyxon-Sporen werden nach dem Aufplatzen der Pansporozyste in das Darmlumen entlassen und über den Darmkanal des Tubificiden ins Wasser abgegeben (EL-MATBOULI 1988; EL-MATBOULI und HOFFMANN 1989; EL-MATBOULI et al. 1992). Nach circa 90 Tagen post infectionem beginnen die Oligochaeten Triactinomyxon-Sporen auszuschleiden (EL-MATBOULI und HOFFMANN 1998). Im Wasser entfalten sich die Sporen zu ihrer typischen Ankerform.

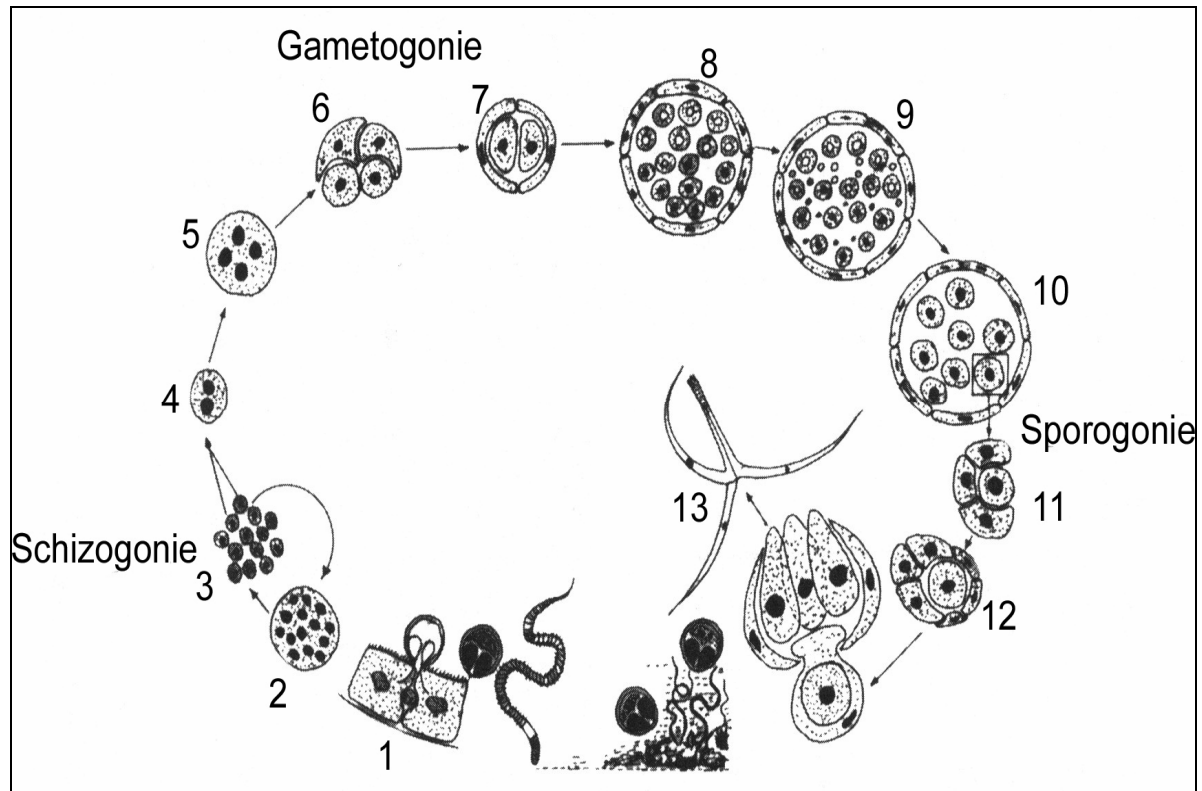


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *M. cerebralis* im Oligochaeten-wirt nach EL-MATBOULI (1998)

2.1.3.2 Entwicklung im Fisch

Die Triactinomyxon-Sporen gelangen durch Kontakt über sekretorische Öffnungen der Epidermisschleimzellen und das respiratorische Kiemenepithel oder durch die orale Aufnahme von infizierten Oligochaeten in den Fischwirt (WOLF und MARKIW 1984; EL-MATBOULI und HOFFMANN 1989) (14)³. EL-MATBOULI und HOFFMANN (1998) berichteten, dass eine Kombination aus chemischen und mechanischen Reizen für die Adhäsion und das Eindringen der Triactinomyxon-Spore nötig ist. Die Sporen schleudern ihre Polfilamente aus, heften sich an und entlassen den Amöboidkeim, der schließlich die Epidermis penetriert. Bereits 5-10 Minuten post expositionem (post exp.) können die Amöboidkeime lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. Im Einzelnen laufen dabei folgende Vorgänge ab (Abbildung 4) (EL-MATBOULI et al. 1995; EL-MATBOULI 1996):

In der ersten Phase, der präsporogonischen Vermehrung, wandert der Amöboidkeim zunächst interzellulär in die Epidermis und das Kiemenepithel ein. Es folgt die Auflösung der die diploiden Amöboidkeimzellen umhüllenden Zelle (15) und die Keimzellen durchlaufen

³ Die Nummern 14 bis 28 beziehen sich auf die Abbildung 4

intrazellulär eine endogene Zellteilung. Aus dieser Sekundärzelle (16), die von einer Primärzelle umschlossen wird, entstehen durch weitere endogene Teilungen Doppelzell-Stadien (17). Diese bestehen wiederum aus einer inneren und einer umhüllenden Zelle und befinden sich nach wie vor innerhalb der Primärzelle (18). Anschließend rupturiert die Zellmembran der ursprünglichen Primärzelle (20). Nach Platzen der Wirtzelle werden die Doppelzell-Stadien (21) freigesetzt und infizieren entweder benachbarte Epithelzellen oder dringen tiefer in die Dermis oder Subkutis ein. Dort kommt es interzellulär zu einer Vermehrung der Doppelzell-Stadien durch weitere endogene Teilungen der Sekundärzellen (22). Schließlich rupturiert die umhüllende Primärzelle (23) und die freigewordenen Doppelzellstadien wandern interzellulär über periphere Nerven zum Zentralnervensystem (Rückenmark 6-14 Tage post exp., Gehirn 16-24 Tage post exp.). Nach 20 Tagen post exp. dringen Doppelzell-Stadien in umgebendes Knorpelgewebe ein, in dem die Sporogonie stattfindet: Zunächst wächst die Primärzelle des Doppelzell-Stadiums, teilt sich und bildet zahlreiche vegetative Kerne. Zeitgleich teilt sich die Sekundärzelle und bildet zahlreiche innere generative Zellen. Dadurch entwickelt sich im Knorpelgewebe ein mehrzelliges Parasitenstadium, welches als Plasmodium bezeichnet wird (24) und 40 Tage post exp. nachweisbar ist (EL-MATBOULI et al. 1995). Nach Auflösung der umhüllenden Zelle (25) wird entweder dieser Sporogonie-Zyklus von jeder einzelnen freigewordenen Zellen wiederholt, wobei sich neue Plasmodien bilden, oder die freigewordenen Zelle vereinigen sich miteinander (EL-MATBOULI et al. 1995) in der Weise, dass eine äußere somatische, sogenannte Perizyten, eine innere generative, sogenannte Sporoblast-Zelle umhüllt (26) und eine Pansporoblaste (27) bildet (EL-MATBOULI et al. 1995). Durch eine anschließende mitotische Teilung entstehen zwei diploide Sporoblasten-Zellen (24), die sich wiederum mitotisch zu 12 diploiden Zellen teilen, welche letztlich zwei reife *M. cerebralis*-Sporen ergeben (28). Dabei umschließen je zwei Schalenhälften-bildende Zellen (Valvogenic cells) zwei Polkapsel-bildende Zellen (Capsulogenic cells) und den zweikernigen Amöboidkeim (KENT et al. 2001; HALLYDAY 1973b). Die reifen Myxosporen sind histologisch ab dem 90. Tag post exp. im Knorpelgewebe nachweisbar (EL-MATBOULI et al. 1992).

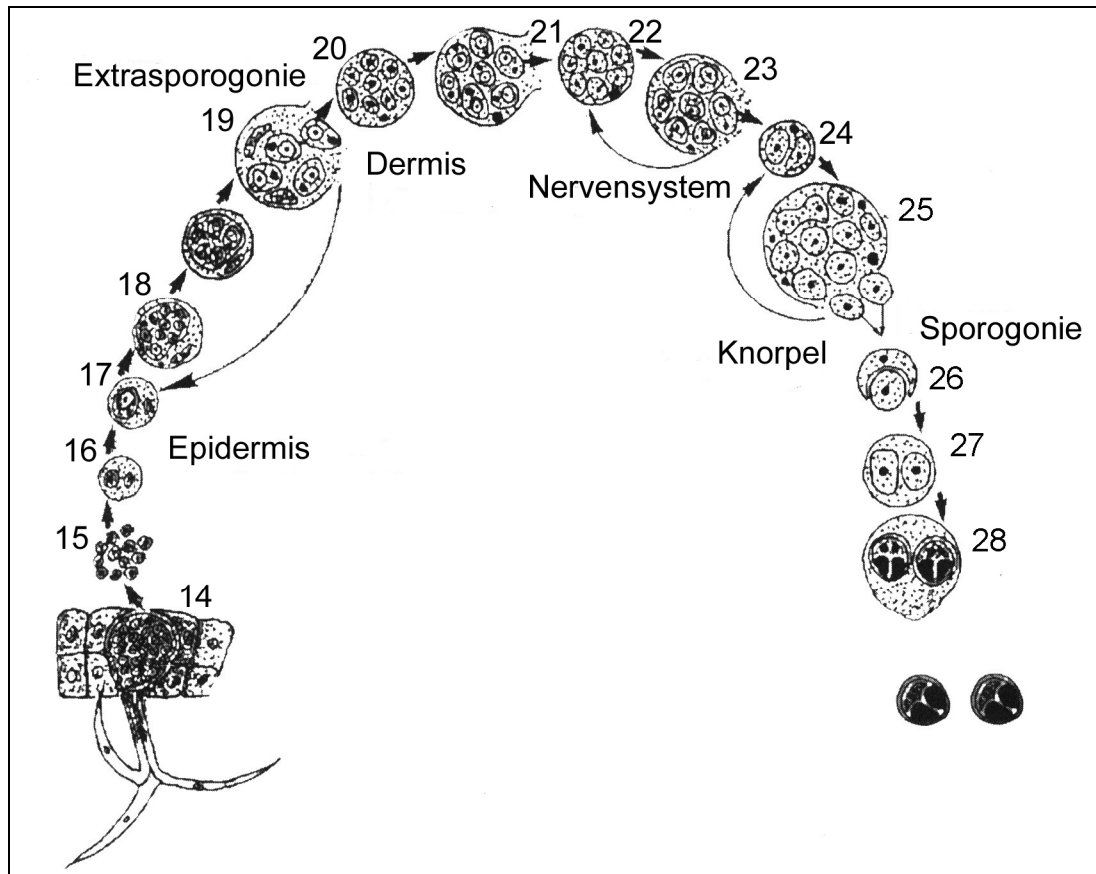


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *M. cerebralis* im Fischwirt nach EL-MATBOULI (1998)

2.2 Biologie der Tubificiden

Die Vertreter der Familie Tubificidae, die auch als "Schlammröhrenwürmer" bezeichnet werden, besiedeln nahezu sämtliche limnische Gewässer mit zum Teil weit über 100.000 Individuen je Quadratmeter Bodenfläche und bilden somit einen wesentlichen Teil des Makrozoobenthos. Der Oligochaet *Tubifex tubifex* (Müller), stellt eine weltweit vorkommende Spezies dar (HOFFMAN 1970). Er ist meistens in der Ufer-, und Tiefenzone von Seen und Fließgewässern verbreitet. Auch in den Absatzbecken von Fischzuchtanlagen und im Abwasser von Bierbrauereien, sowie von Zucker-, und Stärke-Verarbeitenden Fabriken kommt er häufig vor (LIEBMANN 1962). Seine bevorzugte Umwelt sind langsam fließende Gewässer mit sehr vielen organischen Substanzen und tonige Substrate; er ist aber auch in anderen Milieus zu finden. Aufgrund seiner hämoglobinhaltigen Körperflüssigkeit ist der Tubificid in der Lage, auch sehr sauerstoffarme Gewässer zu bewohnen. Er gilt daher als Bioindikator für die starke Belastung eines Gewässers mit organischen Stoffen. Demnach kann der Oligochaet in verschiedenen Biotopen überleben und toleriert extreme

Umweltbedingungen. Er entwickelt und vermehrt sich bei Temperaturen von 0 bis 30 °C, wobei die Optimaltemperatur zwischen 20 und 25 °C liegt (TIMM 1972). Im Labor kann er ohne künstliche Sauerstoffzufuhr 16 Wochen überleben (REYNOLDSON 1987). Bei Nahrungsmangel bilden die Oligochaeten eine schützende Zyste und reduzieren ihre Stoffwechselrate (ANLAUF 1990).

T. tubifex spielt eine doppelte Rolle in der Nahrungskette. Er verändert biochemisch unassimilierbare Sedimente für andere Organismen und stellt eine hervorragende Nahrung für Fische dar.

Im Labor werden die Tubificiden bisher mit Spirulina (Futter aus Algenbasis) gefüttert. In einem Versuch hat KORIOSEK (1974) festgestellt, dass Individuen, die er mit verdorbenem Salat ernährte, die höchste Wachstumsrate und Fruchtbarkeit erreicht wurde. Tubificiden können andere Fischparasiten wie die Cestoden *Archigetes* und *Caryophyllaeus* und die Nematoden *Eustrongylides* übertragen (KENNEDY 1965; MILBRINK 1975; MEASURES 1988).

2.2.1 Taxonomie der Tubificiden

Zum Stamm der Annelida (Ringelwürmer) gehören die zwei Klassen der Polychaeta und Clitellata. Zu letzterer gehört *Tubifex tubifex*, der von Müller schon im Jahr 1774 beschrieben wurde. Dennoch ist die Identifikation und Taxonomie dieser Spezies sowie die weitere Aufgliederung in Subspezies noch nicht komplett abgeschlossen. Bis zur eindeutigen Einordnung von *T. tubifex* in die Systematik der Anneliden gilt die Klassifizierung von BRINKHURST und JAMIESON 1972 (geändert von JAMIESON 1978 (Tabelle 2)). Die Identifizierung basiert hauptsächlich auf morphologischen Kriterien wie Chaeten oder Geschlechtsorganen. Die Tatsache, dass nach der Reproduktionsperiode die Geschlechtsorgane fast zurückgebildet sind und die Form der Chaeten sich je nach Umweltbedingung (Salzgehalt) ändern kann (CHAPMAN und BRINKHURST, 1980), macht es schwierig, eine Bestimmung allein anhand dieser Kriterien durchzuführen. Junge *T. tubifex* können phänotypisch schwer von anderen Oligochaeten mit ähnlichen physikalischen Merkmalen, wie *Ilyodrilus templetoni* und *Rhyacodrilus* spp. unterschieden werden. Nach dem Bestimmungsschlüssel für die in Deutschland verbreiteten Arten, mit besonderer Berücksichtigung von nicht geschlechtsreifen Tieren nach SAUTER 1995, hat *T. tubifex* eine chitinisierte Penisscheide im 11. Segment, ventrale Borsten im 10. Segment und die dorsale Gabelborste im 5. Segment (Abbildung 5). Neue Arbeiten deuten auf die Existenz von *T. tubifex* Subspezies mit unterschiedlichen genetischen Besonderheiten, einschließlich ihrer

unterschiedlichen Empfänglichkeit gegenüber *M. cerebralis* hin (ANLAUF, 1994; ANLAUF und NEUMANN, 1990, 1997; STURMBAUER et al. 1999; BEAUCHAMP et al. 2001, 2002; SJOLIN et al. 2005).

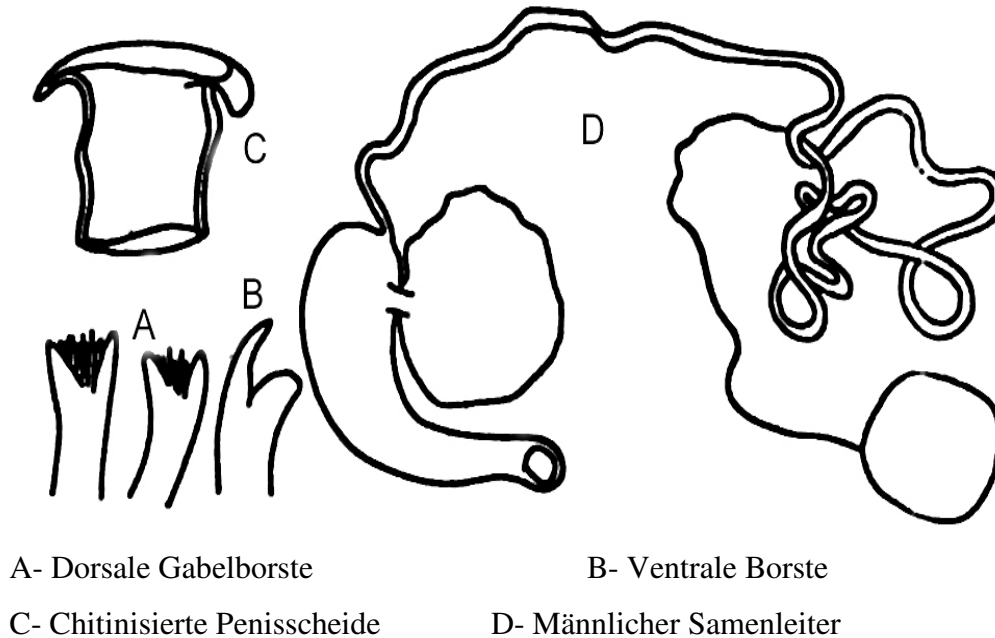


Abbildung 5: Morphologische Erkennungsmerkmale von *T. tubifex* nach SAUTER (1995)

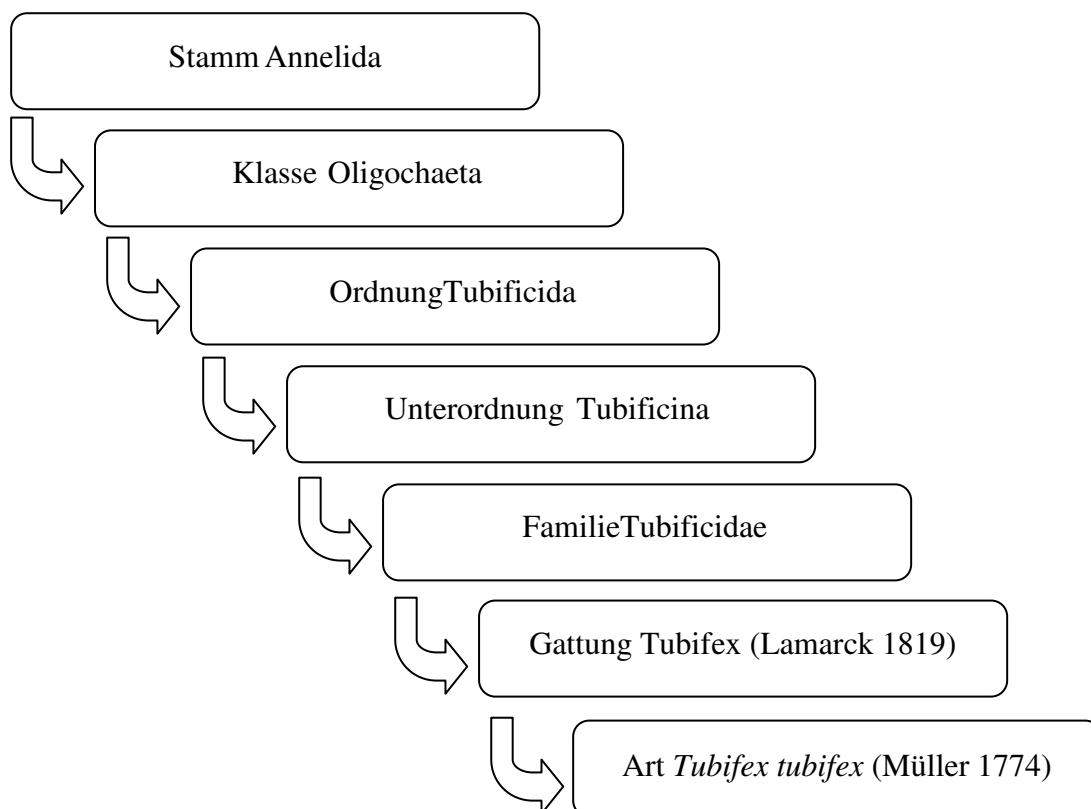


Tabelle 2: Die Stellung von *T. tubifex* in der systemischen Einteilung der Anneliden nach BRINKHURTS und JAMIESON (1972), geändert von JAMIESON (1978).

2.2.2 Biologie der Tubificiden

Tubificiden sind äußerlich homonom segmentierte Würmer (Metamerie). Sie besitzen wenige Borsten, daher der Name "Oligochaet" und können bis zu 6 cm lang und 8 mg schwer werden. Viele Parameter beeinflussen die Geschlechtsreife wie beispielsweise die Wassertemperatur und die Populationsdichte der Tiere. Bei 20 °C und einer Dichte unter 20000 Tieren/m² sind die Oligochaeten schon nach 2 Monaten geschlechtsreif. Bei niedrigen Temperaturen unter 2 °C und Dichten über 70000 Tubificiden/m² kann dies bis zu 10 Monate dauern. Die Oligochaeten sind, abhängig von der Temperatur, der Konzentration des gelösten Sauerstoffs und der Populationsdichte, über einen Zeitraum von 4 bis 12 Monaten fruchtbar. Bei gleichzeitigem Abfall des Sauerstoffgehaltes und der Temperatur wird die Reproduktion gestoppt. Danach müssen sich die Geschlechtsorgane über mehrere Zyklen regenerieren (PODDUBNAYA 1971). Die im Winter und Frühjahr abgelegten Eier werden in einem Kokon (1mm lang; 0,7mm breit) eingeschlossen und entwickeln sich nach 7-26 Tagen, abhängig von der Temperatur. Ein Oligochaet kann, bei optimaler Fütterung und Temperatur, in einem Jahr 100 bis 200 Eier ablegen (TIMM 1972). Die Tiere sind in der Lage, sich durch Parthenogenese (unbefruchtete Eier) asexuell zu vermehren (PODDUBNAYA 1984). Die Anzahl der aus einem Kokon schlüpfenden Tubificiden variiert zwischen 2 und 20 und ist von der Temperatur abhängig. Berichte über die Lebensdauer der Oligochaeten sind sehr unterschiedlich. PODDUBNAYA (1984) berichtet, dass sich durch Parthenogenese vermehrende *T. tubifex* zwischen 70 und 530 Tage leben können. MATSUMOTO und JAMMOTO (1966) geben an, dass *Tubifex hattai* vier bis sechs Jahre leben kann. Obwohl sich die Zahlen stark unterscheiden, kann man davon ausgehen, dass die Oligochaeten mehrere Jahre überleben können.

2.2.3 Wechselwirkung zwischen *M. cerebralis* und *T. tubifex*

Die Aufnahme der *M. cerebralis*-Sporen, die Entwicklung im Darmepithel und die Ausscheidung werden von vielen Umweltfaktoren beeinflusst:

2.2.3.1 Individuelle Wirtsfaktoren

Im Jahr 1983 erkannten MARKIW und WOLF, dass die Entwicklung des Parasiten zu der für den Fisch infektiösen Form nur im Oligochaeten *T. tubifex* stattfindet. So sind zum Beispiel *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Ilyodrilus templetoni*, *Quistadrilus multisetosus* (WOLF et al. 1986), *Dero spp.*, *Stylaria spp.*, *Aeolomsoma spp.* (MARKIW und WOLF 1983), und *Tubifex*

ignotus (EL-MATBOULI und HOFFMAN 1989) nicht empfänglich für *M. cerebralis*. Aufgrund der Infektion nimmt die Reproduktionsfähigkeit der Oligochaeten ab oder kann sich einstellen. GILBERT und GRANATH (2001) zeigten, dass einzelne Individuen lebenslang infiziert sein können und die Ausscheidung von Sporen periodisch erfolgt. In dieser Studie wurden einzelne *T. tubifex* auf die tägliche Triactinomyxon-Produktion hin untersucht; die Infektion wurde mittels PCR überwacht. Ab Tag 74 post inf. bis einschließlich Tag 132 wurden die Sporen ausgeschieden. In dieser Zeit hat jeder Oligochaet durchschnittlich $1.5 \cdot 10^3$ Triactinomyxon-Sporen zwölfmal ausgeschieden. Die Ergebnisse der PCR nach 5, 7, 9 und 15 Monaten post inf. waren positiv und die anhaltende Infektion wurde noch nach 20 Monaten bestätigt.

2.2.3.2 Genetische und geographische Faktoren

Tubificiden zeigen genetische und geographische Unterschiede hinsichtlich ihrer Empfänglichkeit für *M. cerebralis*. STEVENS et al. (2001) zeigte, dass Oligochaeten aus zwei verschiedenen geographischen Regionen der USA unterschiedlich auf die Infektion mit *M. cerebralis* reagieren. *T. tubifex* Populationen aus unterschiedlichen Gebieten in Nordamerika und Europa zeigen eine unterschiedliche Phylogenie (ANLAUF 1994, 1997; STURMBAUER et al. 1999; ÉRSEUS et al. 2000; BEAUCHAMP et al. 2001, 2002; KERANS et al. 2004) und lokale Populationen können aus verschiedenen Stämmen bestehen (BEAUCHAMP et al. 2002; GRANATH und GILBERT 2002). Insgesamt wurden 6 Stämme (6 mitochondriale Linien I-VI) beschrieben. Vier Stämme (I, III, V und VI) aus dem Fluss Colorado (BEAUCHAMP et al. 2001) und fünf (I-V) in Europa (STURMBAUER et al. 1999). Die Stämme II und IV sind bisher nur aus europäischen Gewässern beschrieben worden (STURMBAUER et al. 1999). Die Stämme I und III sind empfänglich gegenüber *M. cerebralis*, während V und VI nicht empfänglich sind (BEAUCHAMP et al. 2002, 2005 und 2006; DUBEY et al. 2005).

2.2.3.3 Ökologische Parameter

Sowohl in Fließgewässern (KORN 1963) als auch in Seen (LANG 1989) werden Tubificiden als Indikator für den ökologischen Zustand eines Gewässers herangezogen. Dabei drücken sich unterschiedliche Umwelteinflüsse in der Veränderung der Artzusammensetzung, der Besiedlungsdichte und im Anteil geschlechtsreifer Tiere einer Art aus. Die Verbreitung von *T. tubifex* ist von der Zusammensetzung sowie dem organischen Anteil des Substrates abhängig. Die Reichhaltigkeit von Tubificiden korreliert also mit der Sedimentationsrate und dem

organischen Kohlenstoffgehalt der Gewässer (ROBBINS et al. 1989). Tubificiden sind in der Lage, durch Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel einer Vergiftung der Atmungskette durch H₂S zu entgehen, wenn der Sauerstoffgehalt weniger als 0,3 mg pro Liter beträgt. Die Energieversorgung erfolgt dann aus Glykogenreserven mit Hilfe der Propionat- und Succinatgärung (HOFFMANN et al. 1987)

Der einflussreichste Faktor bei der Aufnahme von *M. cerebralis*-Sporen und der Ausscheidung von Actinosporen durch den Tubificiden ist nach heutigen Kenntnissen die Wassertemperatur. EL-MATBOULI et al. (1999) fanden die höchste Triactinomyxon-Produktion bei Temperaturen zwischen 10°C und 15°C. Die untersuchten Oligochaeten wurden bei 10 ° C infiziert und gehalten. Die Sporenproduktion stoppt vier Tage nach dem Transfer von 15 °C in 25 °C oder 30 °C warmes Wasser und die Tubificiden weisen nach drei Wochen bei 30 °C keine Entwicklungsstadien mehr auf. Bei Temperaturen, die noch niedriger bzw. höher lagen, war die Ausscheidung sehr gering.

Laut BLAZER et al. (2003) ist bei einer Temperatur von 13 °C in Sand oder Schlamm die Ausscheidung von Triactinomyxon-Sporen am höchsten. Zwischen 9 °C und 17 °C nimmt die Zeitspanne der Entwicklung ab, die Dauer der Ausscheidung verringert sich und die Prävalenz der Infektion steigt. Bei Temperaturen über 17,0 °C beginnen die Tubificiden früher mit der Sporenproduktion. Da die Möglichkeit besteht, dass die Tubificiden lebenslang infiziert sein können und nur in bestimmten Perioden Triactinomyxon-Sporen ausscheiden, ist eine jahreszeitlich abhängige Sporen- Ausscheidung denkbar (GILBERT und GRANATH 2001).

2.3 Die Drehkrankheit

2.3.1 Symptome

Neben der Regenbogenforelle sind noch weitere Arten der Salmoniden empfänglich für eine Infektion mit *M. cerebralis* (HALLIDAY 1976; EL-MATBOULI et al. 1992). Die Ausprägung der klinischen Symptome korreliert mit der Dosis der Triactinomyxon-Sporen und dem Alter der Fische (HEDRICK et al. 2000; RYCE et al. 2004). Da der Knorpel das Zielgewebe der Erreger ist, stellt die Drehkrankheit vor allem ein Problem bei jungen Fischen dar. Je jünger die Fische sind, und je höher der Knorpelanteil (im Stützskelett), desto stärker sind die Krankheitssymptome nach einer Infektion ausgeprägt (HOFFMAN et al. 1962; PUTZ und HOFFMAN 1966). So konnte MARKIW (1992) durch Dauereexposition mit hohen Dosen von Triactinomyxon-Sporen zwar einjährige Forellen infizieren, die Tiere zeigten jedoch keinerlei klinische Symptome. Ältere und klinisch unauffällige Salmoniden müssen daher als potentielle Überträger betrachtet werden (SCHÄPERKLAUS 1931; EL-MATBOULI et al. 1992). Wie vormals schon erwähnt, wird das schnelle horizontale Drehen der Tiere um eine senkrechte Achse durch eine granulomatöse Entzündung im Rückenmark und Hirnstamm verursacht. (ROSE et. al 2000). Diese Drehbewegungen werden durch äußere Stimuli bzw. Stresssituationen ausgelöst. Neben den klinischen Beobachtungen wurden den Versuchstieren auch Teile des Gehirns entnommen und von den erwähnten Autoren histologisch untersucht. Sie entdeckten neben auffälligen strukturellen Veränderungen der äußeren Hirnstammregionen zusätzlich in deren tieferen Arealen kleine aber klare erkennbare Läsionen bei der Hälfte der kranken Fische. Diese Entzündungen umfassten den Perineuralraum und manifestierten sich vorwiegend dort, wo eine Infiltration des betroffenen Areals durch *M. cerebralis* zu erkennen war.

Des Weiteren kommt es in der kaudalen Körperpartie zu einer dunklen Verfärbung der Haut (PLEHN 1905; HALLIDAY 1976; SCHÄPERCLAUS 1990); die Ursache hierfür ist bisher nicht eindeutig geklärt. SCHÄPERCLAUS (1990) vermutet, dass durch den mechanischen Druck der deformierten Knorpelanteile der Wirbelsäule der Nervus Sympathikus und die in ihm enthaltenen pigmentmotorischen Nervenfasern beeinträchtigt werden. Diese irritierten bzw. geschädigten Nervenzellen sind nicht mehr in der Lage die Pigmentzellen des Schwanzes zu innervieren, was zur dunklen Färbung führt. Fische die zum Infektionszeitpunkt einen hohen Knorpelanteil im Skelett haben, zeigen eine deutliche

Deformation an Kopf und Wirbelsäule. Die Genese dieser Symptomatik ist nicht restlos geklärt. Durch die Vermehrung des Parasiten innerhalb des juvenilen Knorpelgewebes des Wirtes kommt es zu einer breitflächigen Zerstörung der Knorpelarchitektur (BECHARA et al. 2003) und einer Verzögerung der enchondralen Ossifikation. Ungleichmäßige Wucherungen im Knorpel, die vermutlich durch parasitäre Proteasen ausgelöst werden (KELLEY et al. 2003, 2004; DÖRFLER und EL-MATBOULI 2007), führen zu Deformationen am Schädel, Missbildungen am Kiefer, Verkürzungen der Kiemen und Verkrümmungen der Wirbelsäule (PLEHN 1905, SCHÄPERCLAUS 1931, HOFFMAN et al. 1962).

Aufgrund der Symptome sind die erkrankten Tiere meistens nicht in der Lage, ausreichend Nahrung zu sich zu nehmen. Die Fische, vor allem diejenigen mit starken Deformationen im Kieferbereich, zeigen geringere Zuchtleistungen, verkümmern und verenden schließlich an Unterernährung. Eine weitere Ursache für Verluste in freier Wildbahn ist die Beeinträchtigung des Fluchtverhaltens wodurch sie schneller Fressfeinden zum Opfer fallen. Die Symptome stellen einen Stressfaktor für die erkrankten Forellen dar und ziehen eine Immunsuppression nach sich, was die Tiere wiederum anfälliger für Sekundärinfektionen macht (PLEHN 1905).

Bei den Tubificiden ist die Pathologie der Erkrankung jedoch wenig erforscht, die Schädigung scheint jedoch weniger ausgeprägt. Veränderung im Hämoglobingehalt (Farbe) und Zerstörung der Darmschleimhaut sind die wichtigsten Befunde. Letzteres ist auf die massive Vermehrung von *M. cerebralis* im Darmepithel zurückzuführen. Folge ist eine Hypotrophie des Gewebes, was zu einer Reduktion der Absorptionsoberfläche und hierdurch zu einer gestörten Futtermittelverwertung führt (EL-MATBOULI und HOFFMAN 1998; HEDRICK und EL-MATBOULI 2002).

2.3.2 Diagnose

Durchschnittlich ab dem 60. Tag post inf. können laut SCHÄPERCLAUS (1990) die Schwarzverfärbung der kaudalen Körperpartie sowie schnelle Drehbewegungen beobachtet werden (PLEHN 1905; HALLIDAY 1976). Eine eindeutige Diagnose kann nur durch den Nachweis der Sporen erfolgen, da die einzelnen Symptome auch durch andere Faktoren, wie Vitaminmangel (WOLF et al. 1981), Enteritiden (PLEHN 1904) sowie genetische bzw. nutritive Ursachen (HALLIDAY 1973b) verursacht werden können. Für den Sporennachweis wird routinemäßig ein Quetschpräparat von Knorpelmaterial angefertigt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet (HOFFMAN et al. 1968). Die histologische Färbung von Schnittpräparaten nach Giemsa oder mittels Methylenblau macht die Sporen besser sichtbar

(SCHÄPERCLAUS 1931). Am lebenden Fisch besteht die Möglichkeit des Nachweises der spezifischen Antikörper im Serum mittels Immunfluoreszenzantikörpertechnik (IFAT) (GRIFFIN und DAVIS 1978) bzw. mittels Peroxidasetechnik ab dem 40. Tag post inf. (HOFFMANN et al. 1991). Am toten Fisch können *M. cerebralis*-Sporen ebenfalls mittels IFAT nachgewiesen werden (MARKIW und WOLF 1978).

Die Triactinomyxon-Sporen können ab dem 90. Tag post inf. im Wasser nachgewiesen werden. Unter dem Mikroskop kann ein geübter Untersucher die Entwicklungsstadien im Darmepithel der Oligochaeten finden. Durch einen histologischen Längsschnitt der Tubificiden mit anschließender Färbung können die Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Durch in situ-Hybridisierung (ANTONIO et al. 1998) können Parasitenstadien sowohl im Oligochaeten als auch im Fisch detektiert werden. Bereits zwei Stunden post exp. bleibt es den Methoden von ANDREE et al. (1998) (nested PCR) und BALDWIN und MYKLEBUST 2002 (single round PCR) vorbehalten, durch eine hochspezifische PCR die 18S ribosomale DNA des Genoms von *M. cerebralis* bei den beiden Wirten nachzuweisen. Als Lösung für eine relativ schnelle Felddiagnostik im Oligochaeten- und Fischwirt haben EL-MATBOULI und SOLIMAN (2005) die Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)-Methode für *M. cerebralis* entwickelt. Mit einer Reihe von sechs Primern und einer DNA-Polymerase kann nach Inkubation bei 65 °C über 60 min lang die DNA des Parasiten vervielfältigt werden.

2.3.3 Differentialdiagnose

Das abnorme Schwimmverhalten kann möglicherweise bei Enteritiden, bei der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) und der Infektiösen Pankreasnekrose beobachtet werden (PLEHN 1904; HALLIDAY 1973). Die Schwarzverfärbung der kaudalen Körperpartie ist generell auf die Schädigung (mechanisch oder durch Toxineinwirkung) der pigmentmotorischen Nervenzellen zurückzuführen. Sie kann auch durch Ascorbinsäure- bzw. Tryptophanmangel sowie Infektionskrankheiten, z.B. durch *Flexibacter psychrophilum* (MARGOLIS et al. 1996) hervorgerufen werden. Des Weiteren führen Sauerstoffübersättigung, Stromeinwirkung (WALKER und NEHRING 1995) und die intravenöse bzw. intramuskuläre Medikamentenapplikation zur Dunkelfärbung der Kaudalpartie. Ascorbinsäure- und Tryptophanhypovitaminose können Skelettdeformationen verursachen (WOLF et al. 1981).

2.3.4 Therapie

Aufgrund der wirtschaftlichen und ökologischen Folgen der Drehkrankheit bemüht man sich weltweit um die Entwicklung erfolgreicher Therapie- und Prophylaxemöglichkeiten. Für SCHÄPERCLAUS (1931) sind das Keulen und die unschädliche Beseitigung aller infizierten Fische zu veranlassen. Dies bedeutet hohe wirtschaftliche Verluste für die betroffenen Betriebe. Erst Jahre später fanden WOLF und MARKIW (1982) heraus, dass lebensmitteltechnische Zubereitungsverfahren, wie das Räuchern, eine Inaktivierung der Myxosporen zur Folge haben. Die Reinigung und Desinfektion der Teichanlagen und Bruthäuser mit Brandkalk, Natronlauge oder Chlorkalk wurde von SCHÄPERCLAUS (1931) und HOFFMAN et al. (1962) empfohlen. Sinnvoller als Naturteiche sind betonierte Teiche, die das Vorkommen der Oligochaeten erschweren. Eine wirksame Dekontamination des Zuflusswassers von Triactinomyxon-Sporen in Wildwasser-gespeisten Betrieben kann durch UV-Licht und Filter erreicht werden (HOFFMAN 1974, 1975; HEDRICK et al. 2000; NEHRING et al. 2003). Trotz der prophylaktischen Empfehlungen gibt es bis jetzt keine Therapie für erkrankte Fische. Obwohl Fumagillin und TNP-470 die Sporenreife im Fisch negativ beeinflussen (SCHOTT 2002) werden im Moment die Abwehrmechanismen für eine spezifische Therapie erforscht.

Ein weiterer Einsatz nutzt die unterschiedliche Anfälligkeit von Fischen, die teilweise auch innerhalb der Arten sehr stark ausgeprägt ist. Mit Hilfe besonders resistenter Zuchtlinien könnte der Infektionsdruck in den Wildgewässern reduziert werden. EL-MATBOULI et al. (2002) untersuchten einen amerikanischen und vier europäische Forellenstämme, die mit unterschiedlichen Triactinomyxon-Dosen infiziert wurden. Die amerikanischen Regenbogenforellen zeigten die kürzesten Inkubationszeiten und höchsten Symptom-Prävalenzen. Die Ergebnisse der quantitativen Sporenerfassung und die histopathologische Beurteilung der Wirtsreaktionen zeigten, dass der amerikanische Stamm signifikant empfänglicher ist, als deutsche Stämme.

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Haltung der Oligochaeten im Laborzyklus zu optimieren. Damit soll geklärt werden auf welchem dieser Substrate (Sand, Schlamm oder Gemisch aus Sand und Schlamm) die Oligochaeten am meistens Triactinomyxon-Sporen ausscheiden, und welche Fütterung eine nachhaltige Entwicklung der Tubificiden ermöglicht. Eine weitere Absicht dieser Arbeit ist es, den Einfluss der Haltungform auf die Entwicklung der Oligochaeten zu untersuchen.

4 Eigene Untersuchungen

4.1 Material

4.1.1 Oligochaeten

Die Tubificiden stammten aus dem Absetzbecken des Beispielsbetriebs für Fischzucht Aufseß in der Fränkischen Schweiz (Landesanstalt für Landwirtschaft) und werden seit ca. vier Jahre in einem 300 L Behälter im Labor gehalten. Sie sind parasitenfrei und werden regelmäßig zweimal in der Woche mit Algae Wafers gefüttert. Es handelt sich um eine Mischpopulation von 90% *Tubifex tubifex* und 10% *Limnodrilus hoffmeisteri*. Die Oligochaeten wurden vorsichtig mit einem Sieb von Schlamm und organischem Material getrennt und einzeln sorgfältig aussortiert, um andere Organismen zu entfernen.

4.1.2 Gewinnung der *M. cerebralis*-Sporen

Zur Gewinnung der *M. cerebralis*-Sporen für die Infektion der Tubificiden wurden insgesamt 14 drehkranke institutseigene Salmoniden benötigt. Die Fische werden in 100 l fassenden Plastiktonnen bei einer Temperatur von 13-15 °C und permanentem Frischwasserzulauf von etwa 0,8 l/min gehalten. Durch einen Kieselgurausströmer wurde eine permanente Anreicherung des Wassers mit Luftsauerstoff gewährleistet. Zur Fütterung der Fische wurde handelsübliches pelletiertes Forellenfutter verwendet.

4.1.3 Versuchsbecken

Insgesamt 21 Plastikbehälter mit einem Fassungsvermögen von 5,4 L wurden gereinigt und anschließend mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Auf dem Deckel wurde ein Loch mit 2 mm Durchmesser für einen Silikonschlauch, der mit einem Sauerstoffverteiler verbunden war, angebracht. Am anderen Ende des Beckens wurde ein Kieselgurausströmer angebracht. In den Becken befanden sich 3 cm Substrat und 4 L entkalktes Wasser (Abbildung 6).



Abbildung 6: Aufnahme der Versuchsbecken

4.1.4 Bodengrund

Sand: Der im Zoohandel gekaufte braune keimfreie Sand wurde 30 Minuten in einem Kochtopf autoklaviert und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen.

Schlamm: Er stammt aus dem gleichen Absatzbecken in Aufseß wie die Oligochaeten und wurde vor dem Autoklavieren mittels eines Siebes mit 2 mm Maschenweite von größeren Partikeln befreit.

Sand und Schlamm: Sand und Schlamm wurden wie oben beschrieben vorbereitet und je die halbe Menge in die Becken gegeben (Tabelle 3).

4.1.5 Füttermischung für die Tubificiden

4.1.5.1 Algea Wafers

Ein aus Algenbasis hergestelltes Futter (Hikari Tropical) wurde in Form von Tabletten aus dem Zoohandel bezogen. Die Futtertabletten wurden in einem Mörser zermahlen. Zweimal in

der Woche wurde ein Teelöffel dieses Pulvers in die Becken gegeben.

Zusammensetzung der Algae Wafers: Weißes Fischmehl, Weizenmehl, Weizenkeimmehl, Alphastärke, dehydriertes Alfalfa Mehl, Sojabohnenmehl, Fischöl, getrocknete Brauerhefe, Shrimpmehl, Spirulina, Karotin, Natriumphosphat, Salz

Analyse der Algae Wafers: Rohprotein 32%; Rohfaser 5%; Rohasche 12%; Feuchtigkeit 10%.
Gehalt an zugesetzt Vitaminen je kg: Vitamin A 32000 IE; Vitamin D₃ 3000 IE; Vitamin E 160 mg, Vitamin C (keine Angabe).

4.1.5.2 Algae Wafers und Sera Vipachips

Wie Algae Wafers wurde Sera Vipachips in Form von Tabletten aus dem Zoohandel bezogen. Die gleiche Menge beider Futtermittel wurde in einem Mörser zu Pulver zerstoßen.

Zusammensetzung der Vipachips: Fischmehl, Weizenmehl, Torulahefe, Krillmehl, Spirulina, Meeresalgen, Fischöl, Brennnessel, Luzerne, Spinat.

Analyse der Vipachips: Rohprotein 37,2%, Rohfaser 4,2%, Rohasche 5,8 %, Rohfett 8,0 %, Feuchtigkeit 7,2 %.

Gehalt an zugesetzten Vitaminen je kg: Vitamin A 38.000 IE, Vitamin D₃ 2.000 IE, Vitamin E 120 mg, Vitamin B₁ 30 mg, Vitamin B₂ 90 mg, Vitamin C 550mg.

4.1.5.3 Tetra-TabiMin und Salat

Ca. 600 g eines frischen Kopfsalates wurde mit ein wenig Wasser und 50 mg Tetra TabiMin Tabletten (Tetra GmbH, Melle, Deutschland) im Mixer zerkleinert und gemischt. Das Homogenat wurde in 5 ml Tubes proportioniert und eingefroren.

Zusammensetzung der Tetra TabiMin: Milch, Molkereierzeugnisse, Fisch- und Fischnebenerzeugnisse, pflanzliche Eiweißextrakte, Getreide, Hefen, Algen, Weichtiere und Krebstiere, Öle und Fette, Zucker, Lezithin

Analyse der Tetra TabiMin: Rohprotein 43%; Rohfett 5%; Rohfaser 1,5%; Rohasche 9,5%; Feuchtigkeit 8%.

Gehalt an zugesetzten Vitaminen je kg: Vitamin A 18560 IE; Vitamin D₃ 1160 IE; Vitamin E 62 mg; Vitamin C 216 mg.

4.1.5.4 Wels-Chips

Die Wels-Chips Futtertabletten wurden in einem Mörser zermahlen. Zweimal in der Woche wurde ein Teelöffel davon in die Becken gegeben.

Zusammensetzung der Wels-Chips: Weizenmehl, Weizenkeime, Fischmehl, Spinat, Luzerne, Spirulina, Meeresalgen, Weidenholz mit Rinde, Erlenholz.

Analyse der Wels-Chips: Rohprotein 35,4%, Rohfaser 5,8%, Rohasche 8,8 %, Rohfett 7,9%, Feuchtigkeit 6,8 %.

Gehalt an zugesetzten Vitaminen je kg: Vitamin A 30.000 IE, Vitamin D₃ 1.500 IE, Vitamin E 60 mg, Vitamin B₁ 30 mg, Vitamin B₂ 90 mg, Vitamin C 550mg

4.1.5.5 Fisch, Salat und Tetra-TabiMin

50 g Rückenmuskulatur wurde mit 600 g Salat und 10 mg Tetra-TabiMin Tabletten im Mixer zerkleinert und gemischt und einmal die Woche frisch zubereitet gefüttert.

4.1.5.6 Fisch

50 g Rückenmuskulatur einer 7 Monate alten Regenbogenforelle wurden fein gehackt und einmal in der Woche frisch zubereitet gefüttert.

In (Tabelle 4) steht die Übersicht des Futtersversuchs.

4.1.6 Die Kontrollbecken

Die Kontrollbecken für den Sand, den Schlamm und das Gemisch Sand + Schlamm wurden mit Algae Wafers gefüttert. Die Tubificiden in den Kontrollbecken wurden nicht infiziert (Tabelle 5).

Becken 1Aund1B:	Sand
Becken 2Aund2B:	Schlamm
Becken 3Aund3B:	Sand und Schlamm

Tabelle 3: Aufstellung der Versuchsbecken für den Substrat (Fütterung: Algae Wafers)

Becken 4Aund4B:	Algae Wafers
Becken 5Aund5B:	Algae Wafers, Vipachips
Becken 6Aund6B:	Tetra-TabiMin, Salat
Becken 7Aund7B:	Wels-Chips
Becken 8Aund8B:	Tetra-TabiMin, Salat, Fisch
Becken 9Aund9B:	Fisch

Tabelle 4: Aufstellung der Versuchsbecken für die Fütterung (Bodengrund: Sand und Schlamm).

Becken 10A:	Sand
Becken 10B:	Schlamm
Becken 10C:	Sand und Schlamm

Tabelle 5: Aufstellung der Versuchsbecken für die Kontrolle (Futter: Algae Wafers)

4.2 Methoden

4.2.1 Gewinnung der *M. cerebralis*-Sporen

Es wurden 14 experimentell infizierte Regenbogenforellen (150 Tage post Infektion) zur Gewinnung der Sporen verwendet. Nach Betäubung der Fische mit MS 222 (0,007%) und anschließender Tötung durch Genickschnitt, wurden der Kopf von Augen und Kiemen und die Wirbelsäule von anhaftender Muskulatur frei präpariert. Das präparierte Material wurde mit etwas Wasser in einen Mixer der Firma Moulinex[®] gegeben und bei höchster Stufe 10 Minuten lang homogenisiert. Grobe Bestandteile wurden mit Hilfe einer Gaze herausfiltriert. Die weitere Behandlung erfolgte mittels der Planktonzentrifugemethode nach O'GRODNICK (1975). Die so erhaltene sporenhaltige Suspension wurde mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. In 20µl der homogenen Suspension wurden unter 10 x 40 fachen Vergrößerung die enthaltenen Sporen lichtmikroskopisch ausgezählt und anschließend die Gesamtmenge errechnet.

4.2.2 Vorbereitung der Tubificiden

1 g wurden von den sortierten Tubificiden abgewogen und die Anzahl der Oligochaeten ermittelt. 1 g enthielten circa 126 Oligochaeten. Auf 15 g aufgerechnet ergab das 1890 Tiere (Abbildung 7). Die Oligochaeten wurden in die Becken gesetzt und Wasser bis auf ein Drittel des Fassungsvermögens aufgefüllt.



Abbildung 7: Oligochaeten vor der Infektion mit *M. cerebralis* Sporen

4.2.3 Infektion der Tubificiden

In 100 ml Sporensuspension waren 16.761.000 Sporen enthalten. Davon wurden 5,5 ml in jedes Becken gegeben, das entsprach einer Infektionsdosis von 490 Sporen pro Wurm. Die Suspension wurde gleichmäßig in den vorbereiteten Becken verteilt. Um eine optimale Aufnahme der Sporen durch die Tubificiden sicherzustellen, wurde im Laufe einer Woche täglich Frischwasser bis zum Erreichen der Beckenkapazität zugefügt und nach zwei Wochen erstmalig zwei Drittel des Wassers gewechselt. Dadurch war eine hohe Initialkonzentration an Sporen gewährleistet, und die Sporen konnten sedimentieren. Die Fütterung erfolgte erst ab der zweiten Woche nach der Infektion, damit die Sporen als einzige Nahrungsquelle in hohen Zahlen von den Tubificiden aufgenommen werden konnten.

4.2.4 Haltung der Oligochaeten

Die Becken wurden in einem Versuchsraum im Keller des Instituts untergebracht. Nach den ersten zwei Wochen ohne Wasserwechsel erfolgte zweimal wöchentlich Wasserwechsel und Fütterung. In jedem Becken befand sich ein Thermometer (Firma Dohse Aquaristik, Bonn, Deutschland), mittels derer alle zwei Tage die Temperatur aufgezeichnet wurde. Einmal am Tag wurde die einwandfreie Sauerstoffversorgung der Becken geprüft.

4.2.5 Untersuchung auf Actinosporea-Befall

Ein Tubificid wurde als infiziert betrachtet, wenn er im Laufe des Versuchs Triactinomyxon-Sporen ausschied. Um die Infektionsrate zu beurteilen, wurden 20 bzw. 60 Tage nach der Infektion jeweils 20 Oligochaeten aus jedem Becken entnommen und in vier Proben von je 5 aufgeteilt. Die Tubificiden wurden durch einen Transversalschnitt in der Körpermitte geteilt, wobei die eine Hälfte für die Histologie und die andere für die PCR verwendet wurde.

4.2.5.1 Histologie

Die vier Proben für die histologischen Untersuchungen wurden sofort auf einem in Formalin eingetauchten Filterpapier gestreckt und anschließend in 5%-igem Formalin 48 Stunden im Kühlschrank gelagert.

Die in Formalin fixierten Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurden sie in Standard-Einbettungskassetten verbracht, diese an der TissueTek[®] Dispensing Console mit flüssigem Parafin ausgegossen und auf der TissueTek[®] Cryo Console ausgehärtet. An einem Mikrotom (Firma Reichert-Jung[®], Modell 1140/Autocut) wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden im Wasserbad bei 40 °C gestreckt und auf Glasobjektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden über Nacht im Trockenschrank bei +60 °C getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert. Die Beurteilung der so vorbereiteten Proben erfolgte unter einem Lichtmikroskop (Firma Zeiss[®]).

4.2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die zweite Hälfte der entnommenen Proben wurde mit PCR untersucht. DNA wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers aus den verbliebenen Tubificidhälften extrahiert. Zur Verifizierung der Infektion wurden die *M. cerebralis*-spezifische Primer nach ANDREE et al. (1998) verwendet:

Forward-Primer: Tr 3-17: 5'-GGCACACTACTCCAACACTGAATTTG-3'

Reverse-Primer: Tr 5-17: 5'-GCCCTATTAAGTGGTAGTATAGAAGC-3'

Die Reaktionsansätze für die PCR bestanden aus:

- | | |
|---|------|
| - 1.1x ReddyMix PCR Master Mix (Abgene, Hamburg, Deutschland) | 17µL |
| - Primer (10 pmol/µl) Tr 3-17 und Tr 5-17 | 2µL |
| - DNA | 1µL |

Der Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Wesseling, Deutschland) wurde wie folgt programmiert:

-Initiale Denaturierung : 95 °C für 5min

-35 Reaktionszyklen mit jeweils

Denaturierung: 95 °C für 1min

Annealing: 65 °C für 1min

Elongation: 72 °C für 10min

-Extension: 72 °C für 1min

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikationsprodukte wurde ein 1,2 %iges Agarosegel (AppliChem Darmstadt, Deutschland) mit 5µl einer 0,5%igen Ethidiumbromid-Lösung (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) hergestellt und in eine DNA Pocket block-Elektrophoresekammer (Biozym Diagnostics, Hess. Oldendorf, Deutschland) gegossen.

Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es mit 120 ml TBE-Puffer überschichtet und jeweils 5 µl des PCR-Produktes in die Probentaschen des Gels pipettiert. In die erste Tasche wurden 4 µl eines 100bp DNA-Markers (Cambrex Bio Science, Inc., Rockland, ME, USA) zugesetzt.

Es wurde eine Spannung von 75 V angelegt. Die Auswertung des Gels erfolgte unter UV-Licht mittels eines Transilluminators

4.2.6 Triactinomyxon-Sporenzählung

Ab dem 90. Tag post inf. wurde zweimal in der Woche das Wasser (drei Liter) in jedem Becken mittels eines Schlauchs abgelassen und durch ein Polyamid Präzisions-Siebewebe (Nylon) mit einer Maschengröße von 20 µm filtriert. Der Rückstand wurde mit einer Spritzflasche vom Sieb ab gespült, in einem Becherglas aufgefangen und auf 50ml aufgefüllt. Von diesem Sporenkonzentrat wurden jeweils 50 µl auf einer 60 mm × 15 mm Petrischale (Sarstedt, Newton, USA) mit 2mm Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (Firma Zeiss®)

bei 10 x 10facher Vergrößerung ausgezählt. Die Anzahl intakter Sporen (Polfilament nicht ausgeschleudert und Amöboidkeim vorhanden) wurde auf das Ausgangsvolumen hochgerechnet.

4.2.7 Untersuchung der Oligochaeten

Nach dem Versuch wurden die Tubificiden aus den Becken gesammelt. Dazu musste der jeweilige Bodengrund dünn (0,5cm) auf einer Gaze aufgetragen werden. Das ganze wurde auf einen Behälter mit Wasser gelegt, dass ein minimaler Kontakt zwischen Wasser und Substrat bestand. Die Oligochaeten verlassen dann das trockene Substrat und wandern ins Wasser. 1 g von diesen Oligochaeten wurde abgewogen und die Anzahl der darin enthaltenen Tubificiden ausgezählt. Die durchschnittliche Länge von 10 Oligochaeten wurde vor und nach dem Versuch ermittelt. Die Produktion der Tubificideneier (Kokons) wurde ebenfalls im Versuchszeitraum aufgezeichnet. Allerdings wurden nur die auf der Wasseroberfläche schwimmenden Kokons erfasst.

4.2.8 Statistik

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden die Daten von der Temperatur bereinigt, damit die Temperaturschwankungen andere Faktoren wie Bodengrund und Fütterung nicht beeinflussen konnten.

Mit der Regressionsformel $Y = 10^{\beta_0} \times 10^{\beta_1 X} \times 10^{\epsilon}$ wurde die geschätzte mittlere Sporenzahl bei einer Temperatur zwischen 13 °C-15 °C und außerhalb dieses Wertes geschätzt. Es liegt bei:

-250 Sporen, wenn die Temperatur sich außerhalb 13 °C-15 °C befindet

-339 Sporen, wenn die Temperatur zwischen 13 °C-15 °C liegt.

Dargestellt in der Graphik sind die multiplikativen Faktoren im Zeitverlauf nach Herausrechnen des Temperatureinflusses. Multipliziert man die multiplikativen Faktoren mit 250/339 erhält man eine Schätzung für die absolute Sporenzahl im Zeitverlauf für ungünstige/günstige Temperatur basierend auf jeweils zwei beobachteten Becken (A und B).

5 Ergebnisse

5.1 Infektionsrate: Histologie und Polymerase-Kettenreaktion

Erste Entnahme (20 Tage post inf.)

Da sich die fünf Proben jeder Gruppe auf dem gleichen Objektträger befanden, wurden sie zusammen beurteilt. Bei den Proben der ersten Entnahme ergab sowohl die Histologie als auch die Polymerase-Kettenreaktion ein negatives Ergebnis. Zwischen den Darmepithelzellen der Tubificiden waren keine Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* nachweisbar. Die Oligochaeten wurden alle mit der gleichen Dosis von *M. cerebralis*-Sporen infiziert.

Zweite Entnahme (60 Tage post inf.)

Die histologischen Untersuchungen erfolgten wie bei der ersten Entnahme.

In insgesamt 14 der 18 Becken war eine Infektion mit *M. cerebralis* nachweisbar (77,77%). Die Proben aus den beiden Sandbecken 1A und 1B, den Schlammbecken 2A und 2B, den Becken mit Sand und Schlamm 5A, 5B, 8A und 8B waren positiv. Die Becken 3A, 4A, 6B und 9B waren ebenfalls positiv. Die restlichen Becken 3B,4B, 6A, und 9A waren negativ. Die Proben aus den Kontrollbecken 10A, 10B und 10C waren ebenfalls negativ (Tabelle 6).

Becken	Ergebnis	Becken	Ergebnis	Becken	Ergebnis
1A	+	5A	+	9A	-
1B	+	5B	+	9B	+
2A	+	6A	-	10A	-
2B	+	6B	+	10B	-
3A	+	7A	-	10C	-
3B	-	7B	+		
4A	+	8A	+		
4B	-	8B	+		

Tabelle 6: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Oligochaeten 60 Tage nach der Infektion mit *M. cerebralis*.

Zur Bestätigung der erfolgten Infektion mit *M. cerebralis* wurde als Ausgangsmaterial für die PCR-Diagnostik die andere Oligochaetenhälfte verwendet (Abbildung 8). Die mittels PCR erhaltenen Ergebnisse (Tabelle 7) standen meistens im Einklang mit der histologischen Auswertung.

In den Becken mit Sand als Bodengrund waren 60% der entnommenen Oligochaeten positiv und die Schlammbecken hatten die höchste Infektionsrate von 70%. In den restlichen Becken mit dem Gemisch Sand und Schlamm waren zwischen 10% und 50% der Tubificiden infiziert (Tabelle 8).

Probe	Ergebnis	Probe	Ergebnis	Probe	Ergebnis	Probe	Ergebnis
1A1	-	3A4	+	5B2	-	7B5	-
1A2	+	3A5	-	5B3	-	8A1	+
1A3	+	3B1	-	5B4	+	8A2	-
1A4	+	3B2	-	5B5	+	8A3	+
1A5	-	3B3	-	6A1	-	8A4	-
1B1	+	3B4	-	6A2	-	8A5	-
1B2	+	3B5	-	6A3	+	8B1	-
1B3	+	4A1	-	6A4	-	8B2	-
1B4	-	4A2	+	6A5	-	8B3	+
1B5	-	4A3	-	6B1	-	8B4	-
2A1	-	4A4	-	6B2	-	8B5	-
2A2	+	4A5	+	6B3	-	9A1	-
2A3	+	4B1	-	6B4	+	9A2	+
2A4	-	4B2	-	6B5	+	9A3	-
2A5	+	4B3	-	7A1	-	9A4	+
2B1	+	4B4	-	7A2	-	9A5	+
2B2	-	4B5	-	7A3	-	9B1	-
2B3	+	5A1	-	7A4	-	9B2	-
2B4	+	5A2	+	7A5	-	9B3	-
2B5	+	5A3	-	7B1	-	9B4	+
3A1	-	5A4	+	7B2	-	9B5	+
3A2	-	5A5	+	7B3	-	10A	-
3A3	+	5B1	-	7B4	+	10B	-
						10C	-

Tabelle 7: PCR-Ergebnisse der untersuchten Oligochaeten 60 Tage post expositionem

Probe	Infektionsrate	Probe	Infektionsrate	Probe	Infektionsrate
1A	60%	5A	60%	9A	60%
1B	60%	5B	40%	9B	40%
2A	60%	6A	20%	10A	00%
2B	80%	6B	40%	10B	00%
3A	40%	7A	00%	10C	00%
3B	00%	7B	20%		
4A	40%	8A	40%		
4B	00%	8B	20%		

Tabelle 8: Prozentuale Infektionsrate nach PCR-Test

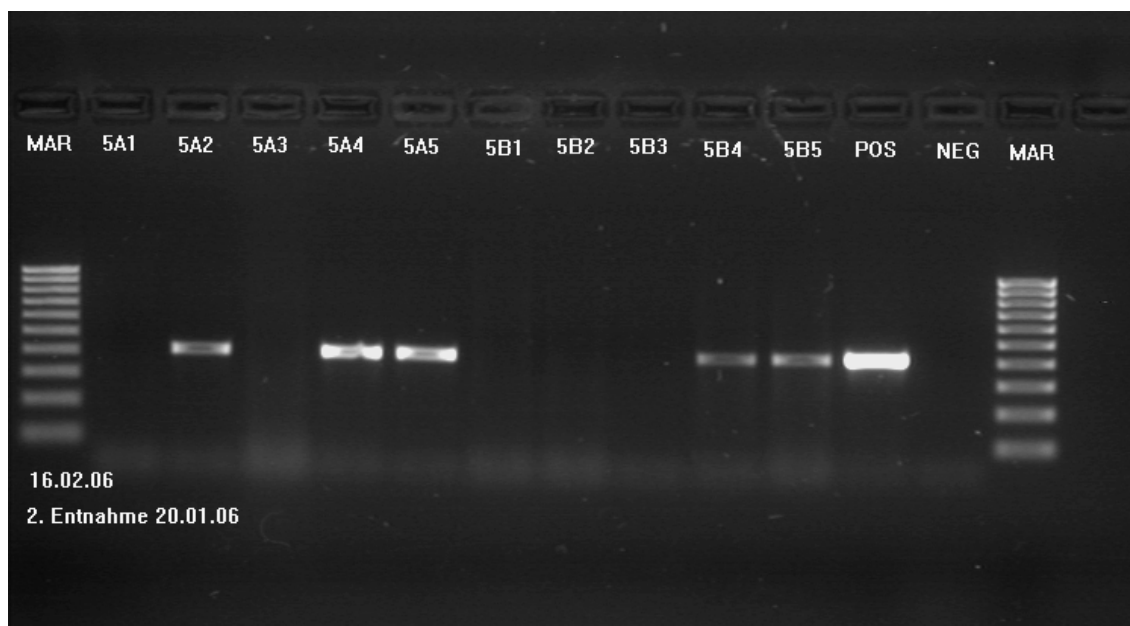


Abbildung 8: Beispiel eines PCR-Ergebnisses der untersuchten Oligochaeten aus dem Becken 5A und 5B 60 Tage post expositionem.

5.2 Verlauf der Triactinomyxon Ausscheidung

Die gesamten Becken wurden zweimal in der Woche filtriert und die Anzahl der Triactinomyxon Sporen (TAMs) unter dem Mikroskop ermittelt. In den Kontrollbecken 10A, 10B und 10C wurden während des gesamten Versuchs (36 Wochen) keine TAMs gefunden. Die ersten TAMs wurden am Tag 108 post exp. ausgeschieden und 62 Tage danach war die höchste Sporenzahl erreicht. Am Tag 142 nach der Infektion waren Sporen in allen Becken vorhanden. Die Sporenproduktion blieb für 14 Tage hoch, bevor sie dann wieder abnahm. Zwischen Tag 215 bis 222 war eine leichte Zunahme in der Sporenproduktion (Abbildung 9) zu verzeichnen. Die TAMs Ausscheidung setzte als erstes in den Becken 7B (Sand und Schlamm, mit Wels-Chips gefüttert) und 8B (Sand und Schlamm und mit Fisch, Salat und Tetra-TabiMin gefüttert). In den Becken 1A und 1B (Sand als Substrat und mit Algae Wafers gefüttert) war die Sporenzahl ab dem 205. Tag post inf. deutlich herabgesetzt und ab dem Tag 236 waren über Filtration keine Sporen mehr in den Sandbecken nachweisbar.

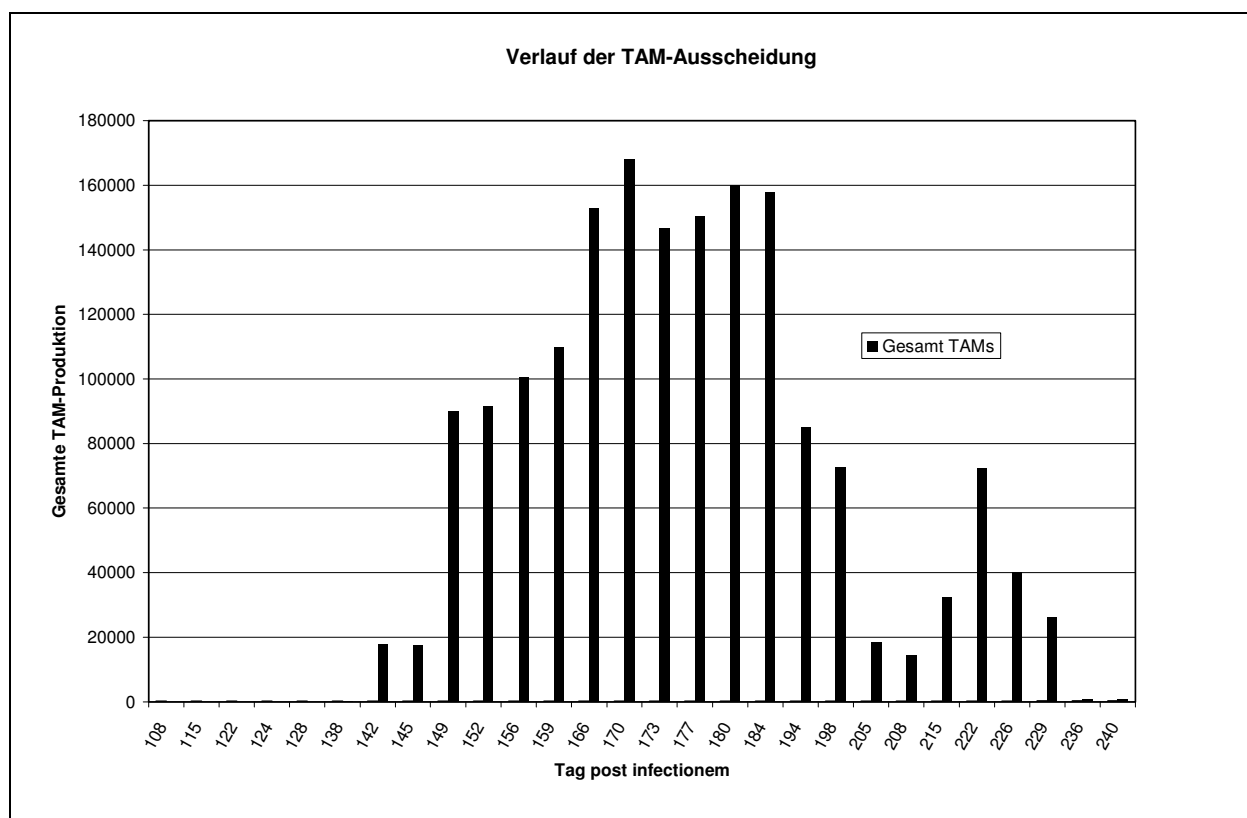


Abbildung 9: Verlauf der TAM-Produktion während des gesamten Versuchs

5.3 Sporenausscheidung im Zusammenhang mit der Temperaturschwankung

Die Temperaturschwankungen in den Versuchsräumen waren von der jahreszeitlichen Variation der Außentemperatur abhängig. Am 18. November 2005, dem Tag der Infektion betrug die Temperatur in den Versuchsbecken 10°C. Die Spannweite der Temperaturvariation im gesamten Versuchszeitraum lag zwischen 6,50°C und 20,00°C wobei am selben Tag nicht alle Becken die gleiche Temperatur aufwiesen. Die Durchschnittstemperatur in allen Becken über den gesamten Versuchszeitraum lag bei 12,36°C. Die durchschnittlich höchste Temperatur von 14,96°C pro Becken wurde im Becken 5A gemessen und die niedrigste von 12,30°C im Becken 10C. Beim Einsetzen der Sporenproduktion betrug die durchschnittliche Temperatur 8°C. Bei einer Temperatur von 10,05°C war in allen Becken mindestens eine Spore nachweisbar. Die Höchste Tagesproduktion aller Becken wurde bei 12,69°C erreicht. Nach Erreichen einer Temperatur von 18°C war ein starker Rückgang der Tagesproduktion aller Becken zu verzeichnen. Diese Zusammenhänge von Temperatur und Sporenproduktion sind in Abbildung 10 zusammenfassend dargestellt.

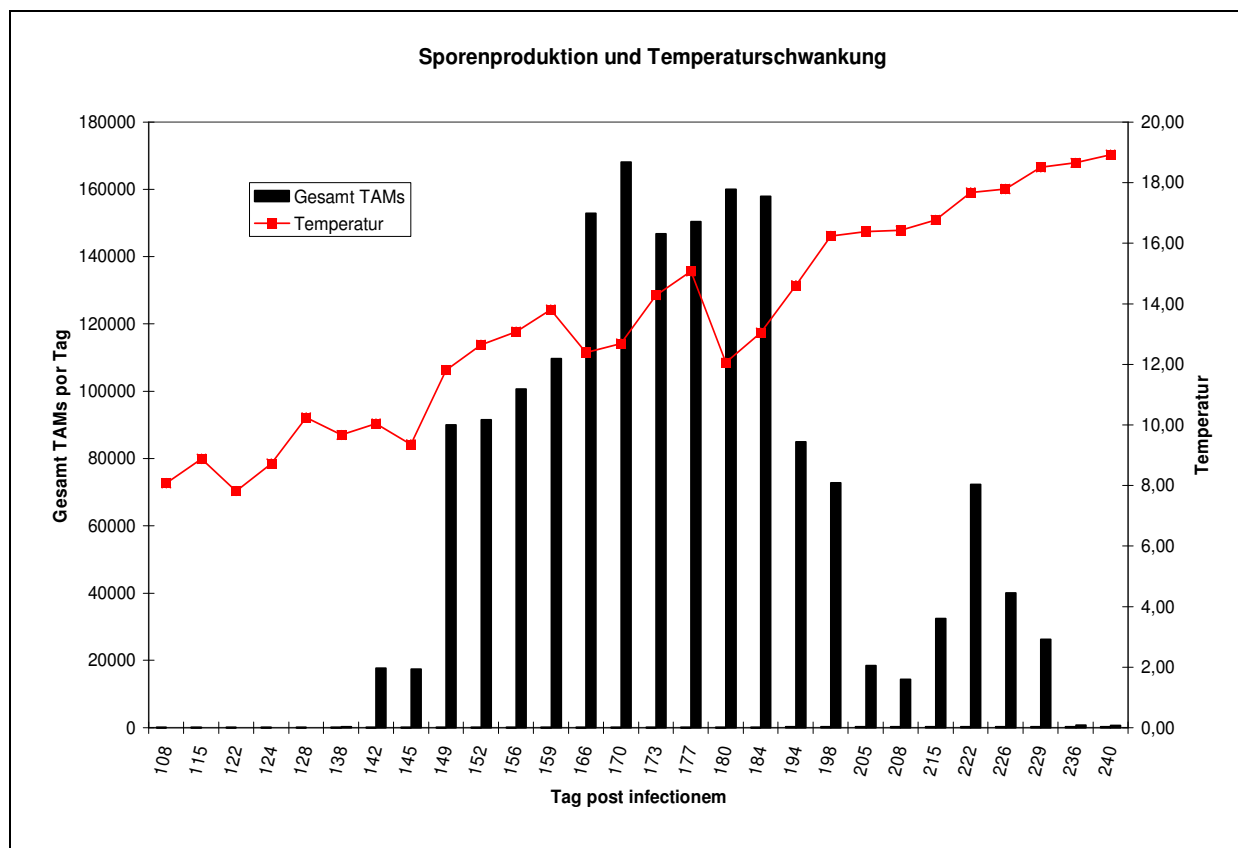


Abbildung 10: Gesamte Sporenproduktion aller Becken und Temperaturverlauf

5.4 Sporenausscheidung im Zusammenhang mit dem Bodensubstrat

Als am förderlichsten für die Sporenproduktion während des gesamten Versuchszeitraums von 36 Wochen erwies sich Schlamm als Substrat für die Oligochaeten, gefolgt von dem Gemisch Schlamm und Sand als Bodengrund. In den Becken die nur Sand als Substrat enthielten war die TAMs-Produktion sehr gering im Vergleich zu den beiden anderen Substraten. In Abbildung 11 ist dieser Unterschied deutlich erkennbar.

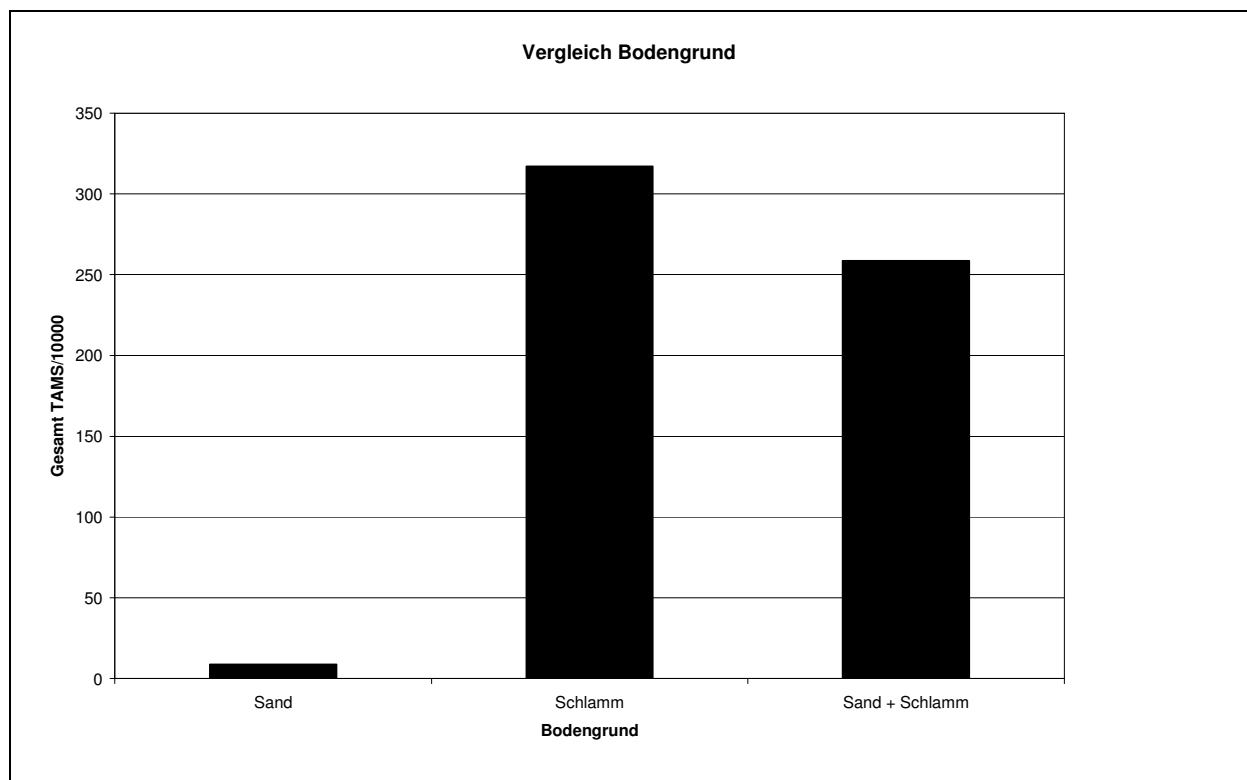


Abbildung 11: Sporenausscheidung von infizierten Tubificiden in Sand, Schlamm sowie Gemisch Sand und Schlamm

Gegen Ende des Versuchs war die Sporenausscheidung am höchsten in den Becken mit dem Gemisch aus Sand und Schlamm.

Aufgrund der Bedeutung der Temperatur für die Entwicklung der Sporen in den Oligochaeten, ist es sinnvoll diese von den anderen Parametern zu bereinigen.

In vorangegangenen Arbeiten (EL-MATBOULI et al. 1998; BLAZER et al. 2003) konnte gezeigt werden, dass das Temperaturoptimum für die Sporenausscheidung zwischen 13-15°C liegt. Mit der Regressionsformel $Y = 10^{\beta_0} \times 10^{\beta_1 X} \times 10^{\epsilon}$ wurde das Residuum (Sporenanzahl von der Temperatur bereinigt) geschätzt. Es liegt bei:

-250 Sporen, wenn die Temperatur sich außerhalb 13-15°C befindet

-339 Sporen, wenn die Temperatur zwischen 13-15°C liegt.

Die absolute Sporenzahl wird mit Hilfe des multiplikativen Faktors und dem Residuum berechnet.

Während des Versuchs war der multiplikative Faktor von Becken 2 (Mittelwert aus Becken 2A und 2B) fast immer höher als der, der anderen Becken. Das Becken 1 (Mittelwert aus Becken 1A und 1B) hat den niedrigsten multiplikativen Faktor.

Die daraus resultierte Graphik (Abbildung 12) zeigt, dass der Schlamm der beste Bodengrund für die Haltung der Tubificiden ist, gefolgt von Gemisch Sand und Schlamm als Substrat.

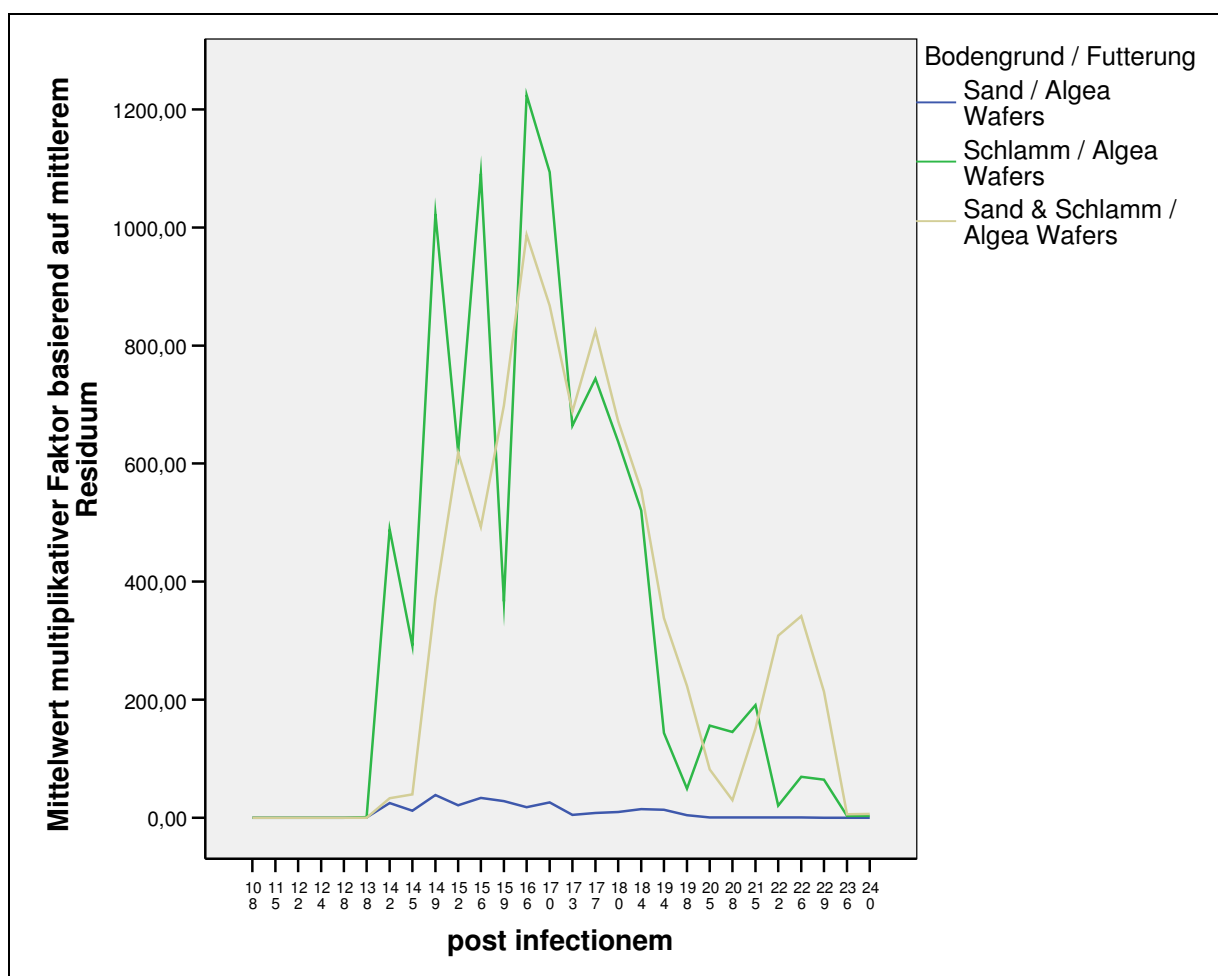


Abbildung 12: Gesamte TAMs in den Becken mit Sand, Schlamm sowie Gemisch aus Sand und Schlamm bereinigt von der Temperatur.

5.5 Sporenausscheidung im Zusammenhang mit der Fütterung

Zusätzlich zur Bedeutung des Substrates wurde der Einfluss von der Fütterung auf die Sporenproduktion untersucht. Die mit Algae Wafers und Vipachips, Algae Wafers und Wels-Chips gefütterten Oligochaeten produzierten die meisten Sporen. Die mit dem Gemisch Tetra TabiMin, Salat und Fisch gefütterten Oligochaeten, hatten eine leicht verminderte Sporenproduktion. Ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Sporenproduktion zeichnete sich jedoch bei der Fütterung mit Tetra TaBiMin und Salat ab. Bei diesen Tubificiden war die Sporenproduktion am niedrigsten. Die Abbildung 13 gibt einen Überblick über den Einfluss der Fütterung auf die gesamte Sporenproduktion. Wie beim Substrat wurde auch hier die Temperatur von dem Parameter Fütterung bereinigt (Abbildung 14).

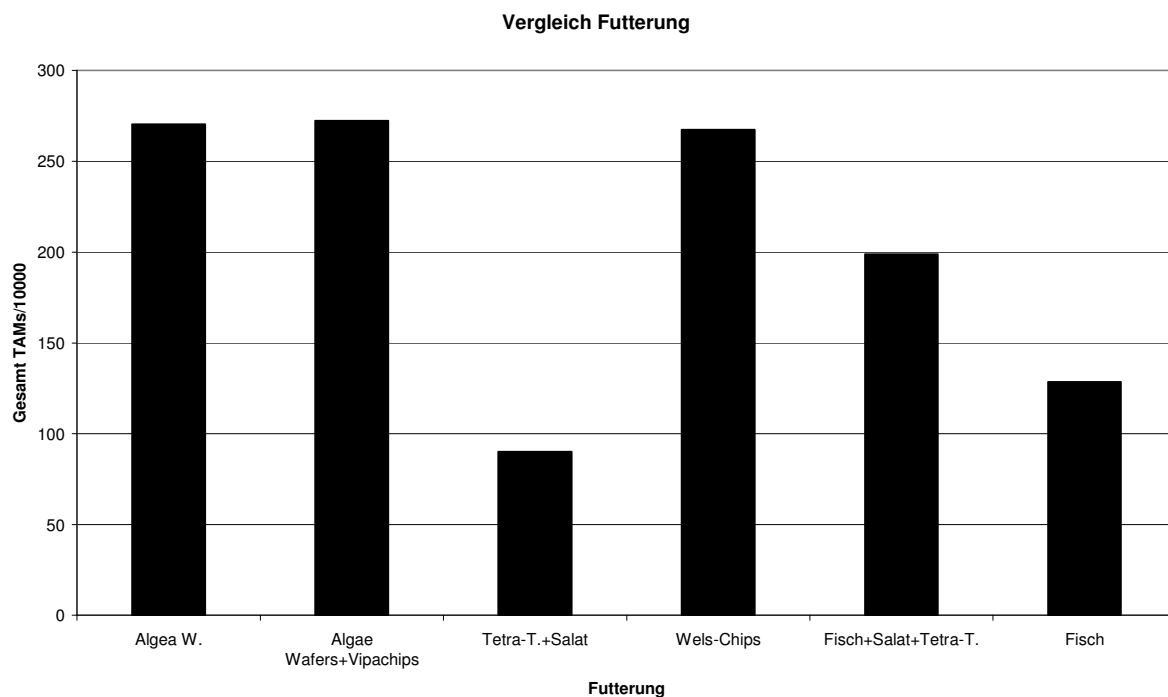


Abbildung 13: Produzierte Triactinomyxonsporen in den Becken mit verschiedenen Futtern

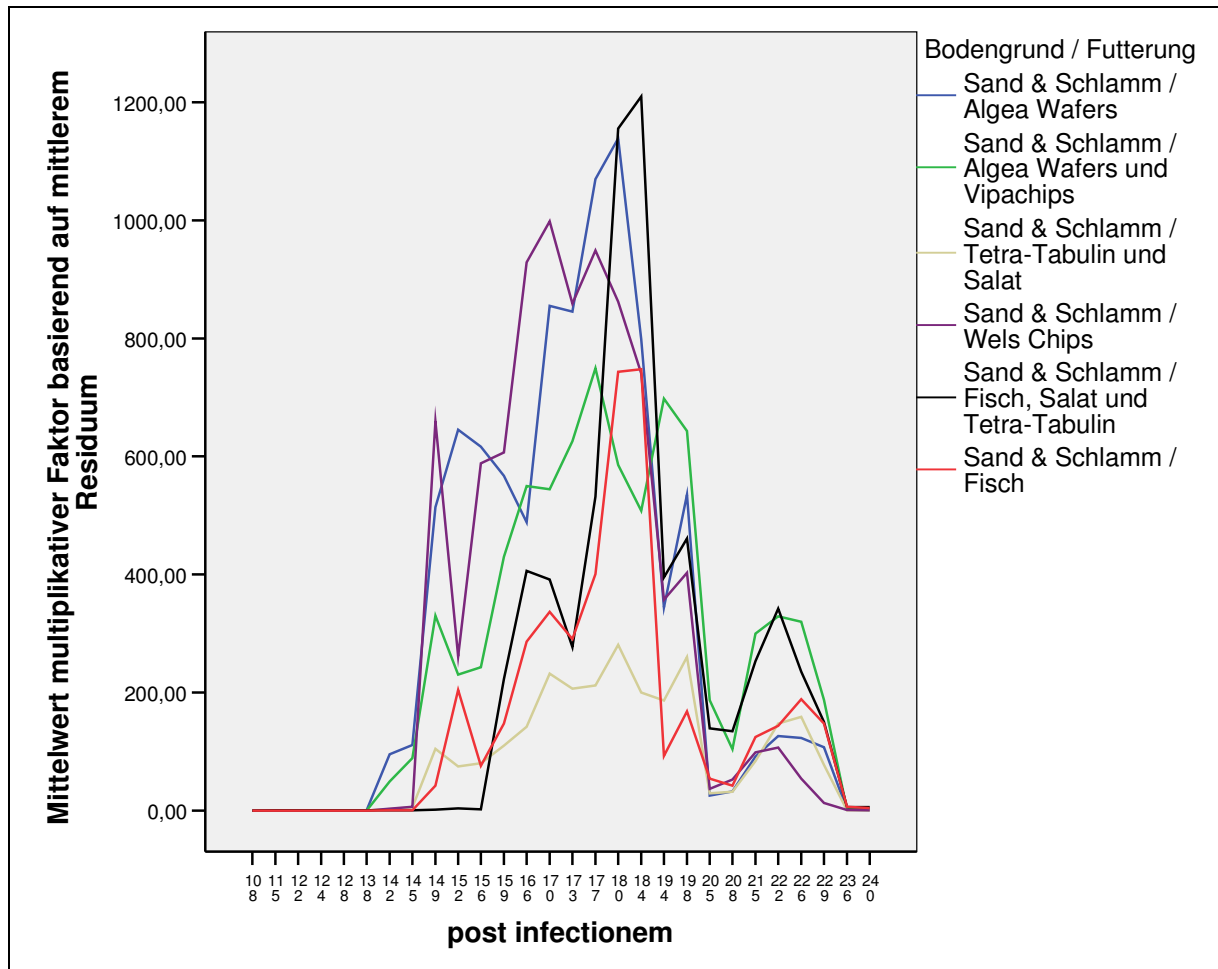


Abbildung 14: Gesamte TAMs in den Becken mit unterschiedlichen Futtern bereinigt von der Temperatur

5.6 Reproduktion und Wachstum der Oligochaeten

Zum Versuchbeginn waren in jedem Becken 15g Oligochaeten enthalten mit circa 126 Tieren pro Gramm. Am Ende des Versuchs wurden die Oligochaeten mit Hilfe einer Gaze aus dem Bodengrund gesammelt. Die gesamte Menge wurde gewogen und die Anzahl der Tiere in einem Gramm ermittelt. Das Endgewicht der im Sand lebenden Tubificiden war im Vergleich zum Versuchsbeginn stark zurückgegangen und die Anzahl der Tiere in 1g hatte sich fast verdoppelt. In diesen Becken waren während des Versuchs keine Kokons zu finden. Das gleiche wurde im Kontrollbecken 10A mit Sand als Substrat beobachtet.

In den Becken mit Schlamm als Bodengrund ist dagegen das Gesamtgewicht der Oligochaeten nach dem Versuch nur leicht zurückgegangen während die Kokon-Bildung in

der 18. bis 22. Wochen nach der Infektion sehr hoch war. Im Kontrollbecken 10C hatte sich das Gesamtgewicht nach dem Versuch sogar leicht erhöht. Hier hat sich die Oligochaetenanzahl in 1g verdreifacht und es konnten zahlreiche Kokons beobachtet werden.

Im dem Gemisch Sand und Schlamm war das Gewicht der Oligochaeten an Ende fast um die Hälfte zurückgegangen, die Ausbildung von Kokons war hier mittelgradig. Die Individuenanzahl in einem Gramm hatte sich ebenfalls erhöht (Tabelle 9).

Becken	Anzahl der Oligochaeten in 1g	Kokon	Endgewicht (g)
Becken 1A und 1B	214	-	02,30
Becken 2A und 2B	396	+++	13,90
Becken 3A und 3B	238	++	07,40
Becken 4A und 4B	267	++	05,70
Becken 5A und 5B	319	+++	06,50
Becken 6A und 6B	325	++	09,90
Becken 7A und 7B	361	++	08,60
Becken 8A und 8B	297	++	07,00
Becken 9A und 9B	274	++	06,40
Becken 10A	227	-	03,70
Becken 10B	347	++	09,10
Becken 10C	470	+++	16,00

Tabelle 9: Vergleich Oligochaeten-Anzahl vor und nach dem Versuch, Eierproduktion (Kokons) und Endgewicht vor und nach dem Versuch. Beurteilung bei der Eierproduktion: (-) keine; (++) mittelgradig; (+++) hochgradig

6 Diskussion

Tubifex tubifex stellt den einzigen Wirt für die Entwicklung der Triactinomyxon-Sporen von *M. cerebralis* dar. Die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Wirt und Parasit spielt stets eine wichtige Rolle in der Erforschung der Erkrankung. Die Tubificiden werden zu diesem Zweck im Labor gehalten außerdem werden sie vermehrt als Futter für Fische eingesetzt. Um den Einfluss von Bodensubstrat und Fütterung auf die Infektion sowie die Entwicklung der Tubificiden während der Laborhaltung zu untersuchen, wurden drei Substrate und fünf Futtermischungen erprobt. An zwei Zeitpunkten wurden Oligochaeten entnommen und histologisch sowie molekularbiologisch auf den Infektionserfolg hin überprüft. Im weiteren Verlauf wurde die Anzahl der produzierten Triactinomyxon-Sporen in jedem Becken erfasst und zum Ende des Versuchs das Wachstum und die Vermehrung der Oligochaeten beurteilt.

Mit der histologischen Untersuchung der 20 Tage post expositionem (post exp.) entnommenen Proben konnte eine Infektion nicht eindeutig festgestellt werden. Es wurden zwar keine Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* zwischen den Darmepithelzellen nachgewiesen; zu diesem Zeitpunkt konnte eine Aufnahme der Sporen durch die Oligochaeten jedoch nicht ausgeschlossen werden. Es bestand die Möglichkeit, dass sich die im Durchschnitt 8 µm großen Sporen sich im Darmlumen der Tubificiden befinden und aufgrund des Darminhaltes bei der mikroskopischen Untersuchung übersehen wurden. So sind bis zum 25. Tag post exp. im Darmlumen der Oligochaeten sowohl intakte Myxosporen von *M. cerebralis* als auch solche mit bereits ausgeschleuderten Polfilamenten elektronenmikroskopisch nachweisbar (EL-MATBOULI und HOFFMANN 1998). Dem gegenüber ist die Polymerase-Kettenreaktion eine sehr sensitive Methode und ermöglicht bereits zwei Stunden post exp. einen sicheren Sporennachweis, wobei ein positives Ergebnis noch keinen Rückschluss auf die tatsächliche Infektion zulässt.

Die Untersuchung der Temperatur als beeinflussendem Faktor in Bezug auf die Dynamik der Infektion und der Sporenproduktion gehörte zwar nicht zu den primären Zielen dieser Arbeit, dennoch konnten Erkenntnisse aus ungewollten Temperaturschwankungen gewonnen werden. Infolgedessen sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Abhängigkeit von den gemessenen Temperaturen zu betrachten.

Beide Untersuchungsmethoden ergaben beim ersten Versuchsansatz ein negatives Ergebnis. Noch fünf Monate post exp. waren keine Triactinomyxon-Sporen in den Versuchsbecken nachweisbar. Dies könnte an der sehr hohen Durchschnittstemperatur von 24 °C während des

gesamten Versuchs gelegen haben. Temperaturen über 20 °C führen innerhalb von 15 Tagen zu Einstellung der Sporogenese. Allerdings reichen diese zwei Wochen nicht aus, um alle Parasitenstadien zu inaktivieren; nach der Rückkehr in den optimalen Temperaturbereich von 15 °C kann sich die Entwicklung jedoch fortsetzen. (EL-MATBOULI et al. 1998). Ein zweiter Versuch fand bei einer Anfangstemperatur von 10 °C statt, die sich im Verlauf zwischen 6,5 und 20 °C bewegte. In diesem Versuchsansatz wurden die ersten Triactinomyxon-Sporen am Tag 108 post exp ausgeschieden; 62 Tage später wurde die höchste Sporenproduktion beobachtet. Bei einer Temperatur von 12,5 °C setzt laut MARKIW (1986) die Sporenproduktion zwischen dem 104. und 113. Tag post exp. ein; an den Tagen 14 bis 60 nach Beginn der Sporenproduktion erreichte sie ihr Maximum. Das unterschiedliche Einsetzen der Sporenproduktion in den Becken könnte auf die variierenden Zeitpunkte der Sporenaufnahme durch die Oligochaeten zurückzuführen sein. Eine unterschiedliche Zeitspanne bis zur ersten Ausscheidung von Sporen ist dann die Folge.

In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen von EL-MATBOULI et al. (1999) ist der Temperaturbereich im Laufe des Versuchs günstig für die Entwicklung der Stadien von *M. cerebralis* - in *T. tubifex*. Es ist anzunehmen, dass viele Mechanismen des Stoffwechsels nur unter bestimmten Temperaturvoraussetzungen optimal ablaufen können. Die gesteigerte Proteinsynthese vor der Parasitenvermehrung könnte möglicherweise von einer optimalen Temperatur abhängen, da außerhalb dieser Temperatur beteiligte Enzyme eventuell nicht oder nur unzureichend aktiviert werden.

Im zweiten Versuchsansatz wich die Infektionsrate der Tubificiden in den verschiedenen Becken deutlich voneinander ab. Hierbei konnte der Einfluss des Substrates und der Fütterung aufgezeigt werden, wenn dies auch, wie bereits erwähnt, in Abhängigkeit von der Temperatur zu betrachten ist. Die Infektionsraten von Oligochaeten im Freiland liegen bei etwa 5 %, obwohl sie in manchen Gebieten bis zu 7,3 % erreichen (WOLF et al. 1986; ZENDT und BERGERSEN 2000). In den histologischen Untersuchungen der hier durchgeführten Infektionsversuche ergab sich ein vergleichsweise hoher Wert von 77 %. Diese sehr unterschiedlichen Werte könnten von den unterschiedlichen Sporendosen bei der Exposition im Laborversuch und im Freiland abhängen. Im Freiland werden nach dem Tod erkrankter Fische die für *T. tubifex* infektiösen Myxo-Sporen von *M. cerebralis* freigesetzt. Dabei handelt es sich um eine deutlich geringere Sporenanzahl, die sich über weite Strecken verteilt. Im Gegensatz dazu werden die Oligochaeten im Laborversuch mit einer konzentrierten Sporendosis innerhalb eines begrenzten Raumes infiziert; somit befinden sich die Sporen in unmittelbarer Nähe der Oligochaeten und können leicht aufgenommen werden.

Ein weiterer Aspekt, den man bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen muss, ist die Zusammensetzung der Oligochaetenpopulation. Die bestand in der vorliegenden Studie aus ca. 90 % *Tubifex tubifex* und 10 % *Limnodrilus hoffmeisteri*. Jedoch sind nicht alle Individuen, die man zu *T. tubifex* zählt, gleichermaßen empfänglich für eine Infektion mit *M. cerebralis*. So produzierten zwei geographisch getrennte Tubificidenpopulationen (Madison River, Montana und Mount Whitney, Kalifornien), infiziert mit der gleichen Dosis *M. cerebralis*-Sporen, signifikant unterschiedliche Sporenzahlen (STEVENS et al. 2000). Letztere Autoren ermittelten zwar nicht die Linien der Populationen, aber die Ergebnisse könnten eventuell teilweise den Unterschied im Schweregrad der Erkrankung in Wildpopulationen von Forellen erklären. Der Anteil der suzeptiblen *Tubifex*-Linien in den verwendeten Kulturen war jedoch nicht bekannt. Durch Selektion kann der Anteil der für den Parasiten empfänglichen *Tubifex* -Linien I und III erhöht werden (BEAUCHAMP et al 2001; STURMBAUER et al. 1999). Durch molekularbiologische Klassifizierung der Linien und gezielte Zucht könnten Oligochaetenkulturen höchstmöglicher Suszeptibilität für einen Laborzyklus etabliert werden.

Die Oligochaeten besiedeln im Freiland nahezu sämtliche limnische Gewässer, was eine Anpassung an unterschiedliches Sediment voraussetzt. Die höchste Gesamtproduktion von Triactinomyxon-Sporen wurde aber bei den in Schlamm gehaltenen Tubificiden verzeichnet. Umgekehrt ist der Sand allein das am wenigsten geeignete der hier untersuchten Substrate hinsichtlich der ausgeschiedenen Sporenzahl. So wird beispielsweise im Freiland eine unterschiedliche Prävalenz der Drehkrankheit beobachtet. Je nach Lage und Flussgeschwindigkeit eines Gewässers besteht sein Bodengrund aus unterschiedlichen Substraten, die die Verteilung der Oligochaeten beeinflussen und somit den Parasitendruck durch die Zahl der Transmissionsstadien. Die natürliche Nahrung von Tubificiden stellt das Bodensubstrat selbst dar, in welchem sich die Nahrung in Form bakterieller Beläge, abgestorbenem Pflanzenmaterial und Kleinstlebewesen befindet. Der Sand wurde jedoch vor dem Versuchsbeginn durch Kochen desinfiziert und anschließend mit destilliertem Wasser gereinigt. Bakterien werden bei Temperaturen von 100 °C abgetötet, sodass durch das anschließende Waschen des Sandes die meisten organischen Partikel abgeschwemmt werden. Der so behandelte Sand ist möglicherweise frei von jeglichen Nährstoffen, welche die Tubificiden aufnehmen könnten. Das knappe Nährstoffangebot für die Oligochaeten und die erst zwei Wochen nach der Infektion eingesetzte Fütterung führten möglicherweise zu einer schnellen und erhöhten Aufnahme der Sporen. Der Bodengrund zur Haltung der Wirte im vorliegenden Parasitenzyklus birgt auch durch seine physikalischen Eigenschaften

unterschiedliche Bedingungen für die Oligochaeten. Die harten und teilweise scharfen Sandkörner stellen eventuell eine Verletzungsgefahr für die Würmer dar, was zu Ausfällen und anschließendem Rückgang der Sporenzahl führen könnte, wie es in den Sandbecken der Fall war. Zu feine Sandkörner behindern vermutlich das Graben der Oligochaeten, was die Fortbewegung erschwert und die damit verbundene Futtersuche unterbindet. Im Gegensatz dazu ist das Substrat der Becken mit vorher abgekochtem Schlamm immer noch reich an Detritus und organischem Material, welche als Nahrung für die Oligochaeten dienen. Der Schlamm, eine Suspension aus fein verteilten organischen Teilchen, verbunden mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm, vermischt sich leicht mit den *M. cerebralis*-Sporen. So sind Sporen überall im Substrat zu finden und können mit dem Schlamm leicht von den Oligochaeten aufgenommen werden. Der Überschuss an Nährstoffen könnte aber zur verzögerten Aufnahme der Sporen aufgrund einer Selektion der Futterpartikel durch die Tiere geführt haben. Zusätzlich erschwert die Trübung durch Schlamm das Filtrieren der Becken zur Gewinnung der Triactinomyxon-Sporen, zumal jede noch so kleine Bewegung zur Aufwirbelung von Sedimentbestandteilen führt. Auch die mikroskopische Zählung der produzierten Sporen wird durch die vergleichsweise großen Schlammpartikel erschwert. Des Weiteren hängen die Partikel teilweise aneinander und dies kann zum Absinken der sonst im Wasser freischwebenden Sporen führen oder aber die Sporen werden nach Wasseraufwirbelungen mit nach unten gezogen und können vom Schlamm bedeckt werden. Günstige Bedingungen für das Wachstum und die Vermehrung von sauerstoffzehrenden Bakterien können zu anoxischen Phasen mit Schwefelwasserstoffbildung führen. Die Auswirkungen solcher Verhältnisse auf die Infektiosität der TAMs oder das Überleben des Parasiten im Wirt sind bis jetzt noch nicht bekannt. Allerdings können hypoxische Bedingungen die Futtermittelaufnahme, sowie den Defäkationsprozeß der Tubificiden verlangsamen oder gänzlich verhindern (GNAIGER et al. 1987; VOLPERS, 1988, 1995).

Der Schlamm zeigte sich im Laufe dieses Versuchs als das geeignetste Substrat zur Haltung der Oligochaeten unter Laborbedingungen. Eine Infektion der Tubificiden im Sandsubstrat mit späterer Zugabe von Schlamm könnte nach den vorliegenden Daten zu einer besseren Infektionsrate als mit Schlamm als alleinigem Substrat führen.

Die Tubificiden ernähren sich von Bakterien und organischen Stoffen, indem sie das sie umgebende Substrat aufnehmen und die nährstoffreichen Anteile verdauen (WAVRE und BRINKHURST, 1971). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Futtermischungen stellten günstige Bedingungen für die Entwicklung und das Wachstum der Bakterienflora bereit. Die Futtermittel für Zierfische enthalten neben Algenextrakten, die reich an Kohlenhydraten,

ungesättigten Fettsäuren und Beta-Karotinen (Provitamin A) sind, auch Meerestiere, Hefe, Stärke, Spurenelemente und Mineralstoffe. (siehe Kapitel: Biologie der Tubificiden). Eisen ist zum Beispiel essentiell für die Hämoglobinbildung der Oligochaeten beim Sauerstofftransport, was ein Überleben in einem sauerstoffarmen Milieu ermöglicht. Dazu braucht *T. tubifex* vermutlich leicht assimilierbares Eisen für die Bildung dieses Farbstoffes. Der Eisengehalt von *T. tubifex* liegt bei 228,76 mg pro 100 g (MALIKOVA 1971). Mit einem Eisengehalt von nur 0,5 mg bzw. 0,65 mg pro 100 g in der Forelle bzw. im Salat kann eventuell keine ausreichende Menge Hämoglobin synthetisiert werden. Dagegen wird dem kommerziellen Fertigfutter üblicherweise Eisen beigemischt, was eine bessere Versorgung der Oligochaeten zur Folge hat. Außerdem ist die Bioverfügbarkeit dieses Mineralstoffes aus solchen Futtermischungen höher als die Bioverfügbarkeit aus Fisch oder Salat. Neben Eisen wurde in *T. tubifex* 0,22 mg Vitamin A und zwischen 0,03 und 0,08 mg Vitamin B₁ und B₂ pro 100 g nachgewiesen (MALIKOVA 1971). Mit durchschnittlich 0,9 mg Vitamin A und zwischen 3 und 9 mg Vitamin B₁ und B₂ pro 100 g decken die kommerziellen Futtermittel den Vitaminbedarf der Oligochaeten. Das zugegebene Futter verteilt sich zunächst im Wasser und auf der Substratoberfläche, danach vermischen sich die Partikel durch Wasserbewegungen (Luftausströmer) leichter mit Schlamm als mit Sand.

Bei den im Sand gehaltenen Oligochaeten ging das Gesamtgewicht im Laufe des Versuchs am stärksten zurück. Dies könnte eine Folge von einer hohen Sterberate durch zu hohe Infektionsdosen in kurzen Zeiträumen sein. Die Infektion löst wahrscheinlich Stress bei den Tieren aus, was zu deren Immunschwächung und anschließendem Tod durch Sekundärinfektionen führen könnte. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die ebenfalls stattfindende Vermehrung der Entwicklungsstadien im Darmepithel und die daraus resultierende Hypotrophie des Gewebes. Die Folge ist eine Reduktion der Absorptionsoberfläche mit gestörter Futtermittelerwertung. Ein solcher Zustand kann das Reproduktionsverhalten der Oligochaeten sicherlich negativ beeinflussen. Im gesamten Versuch wurden keine Kokons in den Sandbecken gefunden. Ein Grund dafür könnte auch in der schlechten Auffindbarkeit (Form, Farbe) der im Substrat verborgenen Kokons in den Sandbecken sein. Im dunkleren Schlamm hingegen waren die hellbraunen Kokons sehr leicht zu identifizieren. Die produzierten Kokons können gesammelt und die daraus schlüpfenden Tubificiden für die erneute Passage von *M. cerebralis*-Sporen benutzt werden. Eine schwierige Frage ist die Notwendigkeit einer Reproduktion im Laborzyklus. Die nach der Infektion geschlüpften Oligochaeten bleiben frei von Parasiten und spielen somit keine Rolle bei der Produktion von Triactinomyxon-Sporen. Die Fruchtbarkeit geht bei einer sehr hohen

Populationsdichte ohnehin zurück und scheint der wichtigste Faktor bei der Regulation der Populationsgröße zu sein (LAZIM und LEARNER 1986). LAZIM und LEARNER (1986) stellten in einer Feldstudie fest, dass sich die Reproduktionsphase im Vergleich zur Haltung im Laborzyklus über einen längeren Zeitraum, mit einem Maximum der Kokonproduktion während der Monate März bis April, erstreckt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit überein.

Aus den gewonnenen Ergebnissen wird klar, dass die Infektion der Oligochaeten auf Schlamm allein oder einer Mischung aus Schlamm und Sand, sowie deren Fütterung mit nährstoffreichen herkömmlichen Zierfisch-Futtermitteln eine hohe Aufnahme der *M. cerebralis*-Sporen bzw. deren weitere Entwicklung gewährleistet. Weitere Arbeiten sind erforderlich um den Effekt von einzelnen Nahrungsbestandteilen auf das Wachstum und Überleben von *T. tubifex* zu erläutern ebenso deren möglichen Einfluss auf eine Infektion mit *M. cerebralis*.

7 Zusammenfassung

Einfluss von exogenen Faktoren auf die Wirt-Parasit- Interaktion bei der Drehkrankheit der Salmoniden

Die erfolgreiche Infektion von *Tubifex tubifex* (Annelida) mit *M. cerebralis* (Myxozoa), dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden, und die anschließende Entwicklung des Parasiten zur Triactinomyxon-Sporen im Darmepithel der Oligochaeten werden von verschiedenen Umweltfaktoren beeinflusst. Geeignete Bedingungen zur Haltung der Oligochaeten spielen während der Kultivierung im Labor eine entscheidende Rolle. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Bodensubstrats und der Futterzusammensetzung auf die Infektionsdynamik der Oligochaeten und die anschließende Sporenproduktion zu untersuchen. Einen weiteren Aspekt stellte die Auswirkung der Parasitose und der Haltungsbedingungen auf die Entwicklung und Reproduktion der Tubificiden dar.

Die mit gleicher Sporendosis infizierten Oligochaeten wurden in Becken mit Sand, Schlamm oder einem Gemisch aus Sand und Schlamm als Substrat gehalten. Unabhängig davon wurden verschiedene Futterzusammensetzungen auf dem Substrat aus Sand und Schlamm getestet. Zum Ende des Versuchs wurde das Gesamtgewicht der in den einzelnen Becken verbliebenen Tubificiden ermittelt, sowie die Bildung von Kokons in den Becken erfasst. Zur Feststellung der Infektionsrate, sowie der Prävalenz wurden 20 und 60 Tage nach der Exposition 20 Oligochaeten entnommen und mittels Histologie und einer für *M. cerebralis* spezifischen Polymerase-Kettenreaktion auf den Infektionserfolg hin untersucht.

Die höchste Infektionsrate zeigten die im Schlamm gehaltenen Oligochaeten, gefolgt von denjenigen in den Sandbecken. Jedoch stellte sich heraus, dass Sand als Bodengrund für die Haltung der Tubificiden weniger geeignet ist; ein Gemisch aus Sand und Schlamm führte zu einem deutlich besseren Ergebnis. Bei der quantitativen Sporenerfassung erwies sich der Schlamm als am besten geeignetes Substrat für die Haltung der Tubificiden und somit die Entwicklung der Parasiten unter Laborbedingungen. Im Futtermittelversuch führten die kommerziellen Zierfisch-Futtermittel zur besten Sporenproduktion, während frisch zubereitete Futtermischungen aus Fisch oder Salat sich als weniger geeignet erwiesen. Am Ende der Versuchsreihe war das Gewicht der verbliebenen Oligochaeten in den Schlammbecken im Vergleich zum Versuchsbeginn nur leicht vermindert. Des Weiteren war die Produktion von Kokons in diesen Becken sehr hoch. In den Sandbecken hingegen war nur ein Siebtel der Tiere nach dem Versuch vorhanden und es waren keine Kokons zu finden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Schlamm als Substrat und kommerzielle Zierfisch-Futtermittel für die Ernährung der Tubificiden unter Laborbedingungen vorzuziehen sind um die höchste Sporenproduktion zu erreichen.

8 Summary

Influence of exogenic factors on the host-parasite interaction in salmonid whirling disease

The effective infection of *Tubifex tubifex* (Annelida) with *M. cerebralis* (Myxozoa), the causative agent of salmonid whirling disease, and the subsequent development of the parasite in the gut epithelium of the oligochaetes are influenced by different environmental factors. The suitable conditions concerning the maintenance of the oligochaetes play an important role for successful *in vivo* cultivation. The aim of this work was to investigate the influence of the substrate and the food composition on the infection dynamics of oligochaetes and the follow-up *M. cerebralis* triactinomyxon spore production. Besides, we also aimed to examine the impact of the parasitic infection and maintenance of the oligochaete culture on their development and reproduction.

The oligochaetes were exposed to the same number of spores and then maintained in basins filled with different substrates: sand, mud, or a combination of sand and mud. Independently, different food compositions were tested on the substrate composed of sand and mud. At the end of the experiment, the total weight of the remaining oligochaetes was measured in every basin and the production of cocoons in the basins was recorded. For the estimation of intensity and prevalence of the infection 20 oligochaetes were examined at 20 and 60 days post exposure with histology and *M. cerebralis* specific polymerase-chain-reactions.

The oligochaetes maintained in mud showed the highest infection rate followed by those kept in the basins containing sand. Our findings also suggest that sand is less suitable for maintaining of the oligochaetes, while the mixture of sand and mud lead to a significantly better result. Concerning the quantitative spore ascertainment, mud was found to be the best substrate for maintenance of *Tubifex tubifex* and thus for the development of the parasite under laboratory conditions.

The feeding trials revealed that commercial diets for ornamental fish lead to the highest spore production, whereas self-made food mixtures composed of fish or salad were less suitable. At the end of the experiment, the weight of the remaining oligochaetes in the mud basins was only slightly reduced compared to the start of the experiment and the production of cocoons was very high. In the sand basins however, only the one seventh of the tubifex-population survived the experiment and no cocoons were found.

As a conclusion we can say that a mud basin and commercial ornamental fish diet for feeding should be applied for *Tubifex tubifex* cultivation in order to reach the highest level of triactinomxon-production under laboratory conditions.

Literaturverzeichnis

ANDREE KB, MCCONNELL E, HEDRICK RP (1998)

A polymerase chain reaction test for detection of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of salmonid whirling disease in fish, and a comparison to existing detection techniques. *Disease of Aquatic Organisms* **34**(2): 145-154.

ANLAUF A (1990)

Cyst formation of *Tubifex tubifex* (Mueller) - an adaptation to survive food deficiency and drought. *Hydrologia* **190**(1): 79-82

ANLAUF A, NEUMANN D (1990)

Genetic differentiation of populations of the oligochaete *Tubifex tubifex* (Müller). *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **83**: 608

ANLAUF A. (1994)

Some characteristics of genetic variants of *Tubifex tubifex* (Müller 1774) (Oligochaeta: Tubificidae) in laboratory cultures. *Hydrobiologia* **278**(1-3): 1-6.

ANLAUF A. NEUMANN D. (1997)

The genetic variability of *Tubifex tubifex* (Müller) in 20 populations and its relation to habitat type. *Archiv für Hydrobiologie* **139**(2): 145-162

ANTONIO DB, ANDREE KB, MCDOWELL TS, HEDRICK RP (1998)

Detection of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and oligochaete tissues by using a non radioactive in situ hybridization (ISH) protocol *Journal of Aquatic Animal Health* **10**, 338-347

BALDWIN TJ, MYKLEBUST KA (2002)

Validation of a single round polymerase chain reaction assay for identification of *Myxobolus cerebralis* myxospores. *Dis Aquat Organ.* **49**(3): 185-90

BEAUCHAMP KA, KATHMAN RD, MCDOWELL TS, HEDRICK RP (2001)

Molecular phylogeny of tubificid oligochaetes with special emphasis on *Tubifex tubifex* (Tubificidae). Mol. Phylogenet. Evol. **19**(2): 216-24

BEAUCHAMP KA, GAY M, KELLEY GO, EL-MATBOULI M, KATHMAN RD, NEHRING RB, HEDRICK RP (2002)

Prevalence and susceptibility of infection to *Myxobolus cerebralis*, and genetic differences among populations of *Tubifex tubifex*. Dis. Aquat. Organ. **51**(2): 113-21

BEAUCHAMP KA, KELLEY GO, NEHRING RB, HEDRICK RP (2005)

The severity of whirling disease among wild trout corresponds to the differences in genetic composition of *Tubifex tubifex* populations in central Colorado. J. Parasitol. **91**(1): 53-60

BEAUCHAMP KA, EL-MATBOULI M, GAY M, GEORGIADIS MP, NEHRING RB, HEDRICK RP (2006)

The effect of cohabitation of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta: Tubificidae) populations on infections to *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa: Myxobolidae). J. Invert. Pathol. **91**(1): 1-8

BECHARA IJ, YOUSSEF NN, ROBERTS DW (2003)

Histologic study of head cartilage degeneration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with the parasite *Myxobolus cerebralis*. J Submicrosc Cytol Pathol. **35**(2): 111-6

BLAZER VS, WALDROP TB, SHILL BW, DENSMORE CL, SMITH D (2003)

Effects of water temperature and substrate type on spore production and release in eastern *Tubifex tubifex* worms infected with *Myxobolus cerebralis*. J. Parasitol., **89**(1) 2003 pp 21-26

BRINKHURST RO, JAMIESON BGM (1972)

Aquatic Oligochaeta of the world. Oliver and Boyd, Edinburgh, 860 p.

BRINKHURST RO (1971)

Interspecific interactions and selective feeding by tubificid oligochaetes. Limnology and Oceanography **17**: 122-133

BRINKHURST RO (1974)

Factors mediating interspecific aggregation of tubificid oligochaetes. Journal of the Fisheries Research Board of Canada **31**: 460-462

BRINKHURST RO (1996)

On the role of tubificid oligochaetes in relation to fish disease with special reference to the Myxozoa. Annual Review of Fish Disease **6**: 29-40

CHAPMAN PM, BRINKHURST RO (1980)

Salinity tolerance in some selected aquatic oligochaetes. Int. Rev. Ges. Hydrobiol. **65**(4): 499-505

DÖRFLER C, EL-MATBOULI M (2007)

Isolation of a subtilisin-like serine protease gene (*MyxSubtSP*) from spores of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. Disease of Aquatic Organism **73**: 245-251

DUBEY R, CALDWELL CA, GOULD WR (2005)

Effects of temperature, photoperiod, and *Myxobolus cerebralis* infection on growth, reproduction, and survival of *Tubifex tubifex* lineages. Journal of Aquatic Animal Health **17**:338-344

EL-MATBOULI M (1988)

Untersuchungen zum Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis* und *M. cotti* - Übertragung sowie licht- und elektronenmikroskopische Befunde. Diss. Rer. Nat. Ludwig-Maximilians-Universität München

EL-MATBOULI M, HOFFMANN RW (1989)

Experimental transmission of two *Myxobolus spp.* Developing progeny via tubificid worms. Parasitology Research **75**(6), 461-464.

EL-MATBOULI M, HOFFMANN RW (1991)

Effects of freezing, aging, and passage through the alimentary canal of predatory animals on the viability of *Myxobolus cerebralis* spores. *Journal of Aquatic Animal Health* **3**: 260-262
29, 70-75.

EL-MATBOULI M, FISCHER-SCHERL, HOFFMANN RW (1992)

Present knowledge on the life cycle, taxonomy, pathology and therapy of some *Myxosporea* spp. important für fresh water fish-a review. *Annual Review of Fish Diseases* **2**: 367-402

EL-MATBOULI M, HOFFMANN RW, MANDOK C (1995)

Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *myxobolus cerebralis* from epidermis into the rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) cartilage. *J. Fish Biol.* **46**: 919-935

EL-MATBOULI M (1996)

Biologie und Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* HOFER 1903 (Myxozoa). Habilitationsschrift aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

EL-MATBOULI M & HOFFMANN RW (1997)

The life cycle of *Myxobolus cerebralis* with special regard to their development in *Tubifex Tubifex*. 10th International congress of protozoology. Sydney, 21-25 July, 80 (Abstract).

EL-MATBOULI M & HOFFMANN RW (1998)

Light and electron microscopic studies on the chronogical development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex*. *International journal for Parasitology* **28**: 195-217.

EL-MATBOULI M, MCDOWELL TS, MUKKATIRA K & HEDRICK RP (1998)

Susceptibility of two different populations of tubificids to *Myxobolus cerebralis*. Whirling Disease Symposium: Research in Progress, February 19-21 Colorado State University.

EL-MATBOULI M, MCDOWELL TS, HEDRICK RP (1999)

Effect of temperature on the development of the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* in the Intestine of *Tubifex tubifex*. Light and electron microscopic observations. Whirling Disease Symposium: Research in progress, February 19-21 Colorado State University.

EL-MATBOULI M, KÜPPERS MP, MCDOWELL TS, HEDRICK RP (2002)

Comparative susceptibility of different rainbow trout strains to infection with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. Fourth International Symposium on Aquatic Animal Health, New Orleans, Louisiana, USA, September 1-5

EL-MATBOULI M, SOLIMAN H (2005)

Development of a rapid assay for diagnosis of *Myxobolus cerebralis* in fish and oligochaetes using Loop-mediated isothermal amplification

Journal of Fish Diseases **28**: 549-557

ÉRSEUS C, PRESTEGAARD T, KALLERSJO M (2000)

Phylogenetic analysis of Tubificidae (Annelida, Clitellata) based on 18S rDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **15**(3): 381-9

FAMME P; KNUDSEN J (1985)

Anoxic survival, growth and reproduction by the freshwater annelid *Tubifex sp.* demonstrated using a new simple anoxic chemostat. *Comp. Biochem. Physiol.* **81** : 251-253

GRASSÈ PP (1970)

Embranchement des Myxozoaires. Précis de Zoologie (Grassé, Poisson, R.a. und Tuzet, O, eds) Vol. 1, Invertébrés, Paris, Masson

GILBERT MA, GRANATH WO (2001)

Persistent infection of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of salmonid Whirling Disease, in *Tubifex tubifex* *Journal of Parasitology* **87**(1), 2001 p. 101-107

GILBERT MA, GRANATH WO (2002)

The Role of *Tubifex tubifex* (Annelida: Oligochaeta: Tubificidae) in the Transmission of *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa: Myxosporidia: Myxobolidae). American Fisheries Society Symposium **29**: 79-85, 2002

GILBERT MA, GRANATH WO (2003)

Whirling Disease of salmonid fish: life cycle, Biology and disease. Journal of Parasitology **89**(3), 2003 p 658-667

GRIFFIN BR, DAVIS EM (1978)

Myxosoma cerebralis: Detection of circulating antibodies in infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Journal of the Fisheries Research Board of Canada **35**, 1186-1190

HALLIDAY MM (1973a)

Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids I .The diagnosis of infection Nordisk Veterinærmedicin **25**, 345-348

HALLIDAY MM (1973b)

Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids. II. The development and pathology of *Myxosoma cerebralis* in experimentally infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry reared at different water temperatures. Nord Vet Med. **25**(7): 349-58

HALLIDAY, M. M. (1976)

The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease in salmonids Journal of Fish Biology **9**, 339-35

HEDRICK RP, GROFF JM, FOLEY P, MCDOWELL T (1988)

Oral administration of Fumagillin DCH protects Chinook salmon *Onchyrhynchus awytscha* from experimentally induced proliferative kidney disease, *Diseases of Aquatic Organisms* **4**: 165-168

HEDRICK RP, EL-MATBOULI M, ADKINSON MA, MCCONNELL E (1998)

Whirling Disease. Re-emergence among wild trout. Immunol. Rev. **166**: 365-376

HEDRICK RP, MCDOWELL TS, MARTY GD, MAKKATIRA K, ANTONIO DB,
ANDREE KB, BUKHARI Z, CLANCY T (2000)

Ultraviolet irradiation inactivates the waterborne infective stages of *Myxobolus cerebralis*: a treatment for hatchery water supplies Diseases of Aquatic Organisms **42**, 53-59

HEDRICK RP, EL-MATBOULI M (2002)

Taxonomic, Life Cycle, and Development of *Myxobolus cerebralis* in the Fish and Oligochaete Hosts. American Fisheries Society Symposium **29**: 45-53

HOFER B (1903)

Über die Drehkrankheit der Regenbogenforelle. Allgemeine Fischereizeitung **28**: 7-8

HOFFMAN GL, BUNBAR CE, BRADFORD A (1962)

Whirling Disease of trout caused by *Myxobolus cerebralis* in the United States. U.S. Department of the Interior, Special Scientific Report Fisheries **427**: 15pp

HOFFMAN GL, PUTZ RE (1969)

Host susceptibility and the effect of aging, freezing, heat, and chemical on spores of *Myxosoma cerebralis*. Porgve. Fish cult. **31**: 35-37

HOFFMAN GL (1970)

Intercontinental and transcontinental dissemination and transfaunation of fish parasite with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). In: Sniezko SF (ed.) Symposium on Disease of Fisheries and Shellfish. American Fisheries Society, pp 69-81

HOFFMAN GL (1974)

Disinfection of contaminated water by ultraviolet irradiation, with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*) and its effect on fish Transactions of the American Fisheries Society **103**, 541-550

HOFFMAN GL (1974)

Whirling disease (*Myxosoma cerebralis*): control with ultraviolet irradiation and effect on fish Journal of Wildlife Diseases **11**, 505-507

HOFFMAN GL (1977)

Control of whirling disease (*myxosoma cerebralis*): use of methylen blue staining as a possible indicator of effect of heat on spore. *Journal of fish Biology* **10**: 181-183

HOFFMANN KH, HIPPEL E, SEDLMEIER U (1987)

Aerobic and anaerobic metabolism of the freshwater oligochaete *Tubifex* sp. *Hydrobiologia* **155**: 157-158

HOFFMANN RW, EL-MATBOULI M, HOFFMANN-FEZER G (1991)

Nachweis von Antikörpern gegen *Myxobolus cerebralis* bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Fachgruppe Fischkrankheiten (Hrsg.) Tagung Schmiedefeld/Thüringen, 14.-16. 11. 1990, 135-139

JAMIESON BGM (1978)

Phylogenetic and phenetic systematics of the opisthoporou Oligochaeta (Annelida: Clitellata). *Evolutionary Theory* **3**: 195-233

KARMINOVA EM (1968)

Diectophymidea of animals and man and their of causation disease. *Essentials of Nematology* XX. K. I. Skrjabin (ed.). Izdatelstvo Nauk, Moscow. AN SSR: 383 pp.

KELLEY GO, ADKISON MA, LEUTENEGGER CM, HEDRICK RP (2003)

Myxobolus cerebralis: identification of a cathepsin Z-like protease gene (MyxCP-1) expressed during parasite development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Exp Parasitol.* **105**(3-4): 201-10

KELLEY GO, ZAGMUTT-VERGARA FJ, LEUTENEGGER CM, ADKISON MA, BAXA DV, HEDRICK RP (2004)

Identification of a serine protease gene expressed by *Myxobolus cerebralis* during development in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ.* **59**(3): 235-48

KENNEDY CR (1965)

The life history of *Archigetes limnodrilii* (Yamaguti) (Cestoda: Caryophyllaeidae) and its

development in the invertebrate host. *Parasitology* **55**: 427-437.

KENT ML, MARGOLIS L, CORLISS JO (1994)

The demise of a class of protists: Taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protest phylum Myxozoa Grassé

Canadian Journal of Zoology **72**, 932-937

KENT ML, ANDREE KB, BARTHOLOMEW JL, EL-MATBOULI M, DESSER SS, DEVLIN RH, FEIST SW, HEDRICK RP, HOFFMANN RW, KHATTRA J, HALLETT SL, LESTER RJ, LONGSHAW M, PALENZEULA O, SIDDALL ME, XIAO C (2001)

Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**: 395-413

KERANS BL, RASMUSSEN C, STEVENS R, COLWELL AE, WINTON JR (2004)

Differential propagation of the metazoan parasite *Myxobolus cerebralis* by *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Ilyodrilus templetoni*, and genetically distinct strains of *Tubifex tubifex*. *J. Parasitol.* **90**(6): 1366-73

KORN H (1963)

Studien zur Ökologie der Oligochaeten in der oberen Donau unter Berücksichtigung der Abwassereinwirkungen. *Archiv für Hydrobiologie* **27**: 131-182

KOSIOREK D (1974)

Development cycle of *Tubifex tubifex* Muller in experimental culture. *Polish Archives of Hydrobiology* **21**: 411-422

LANG C (1989)

Effects of small-scale sedimentary patchiness on the distribution of tubificid and lubriculid worms in Lake Geneva. *Freshwater Biology*, **21**: 447-481

LAZIM MN, LEARNER MA (1986)

The life cycle and productivity of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta; Tubificidae) in the Moat-Feeder stream, Cardiff, South Wales. *Holarc. Ecol.* **9**: 185-192

LEVINE ND, CORLISS JO, COX FEG, DEROUC G, GRAIN J, HONIGBERG BM, LEEDALE G F, LOEBLICH AE, LOM J, LYNN D, MERINGFELD EG, PAGE FC, POLJANSKY G, SPRAGUE V, VAVRA J, WALLACE FG (1980)

A newly revised classification of the Protozoa *Journal of Protozoology* **27**, 37-58

LIEBMANN H (1962)

Handbuch der Frischwasser und Abwasser-Biologie. Jena, G Fischer Verlag

LOM J, DUKOVÀ I (1992)

Protozoan Parasites of fish. Elsevier, New York 315pp.

LOM J, DUKOVÀ I (1995)

Myxosporea (Phylum Myxozoa). In: Wo (ed.), Fish Diseases and Disorders, Vol. 1: Protozoan and metazoan infections, CAB International, Wallington 97-148

LOM J, HOFFMAN GL (1971)

Morphology of the spores of *Myxosoma cerebralis* (Hofer, 1903) and *M. cartilaginis* (Hoffman, Putz and Dunbar, 1965). *J. Parasitol.* **57**(6): 1302-8

LOM J, & NOBLE ER (1984)

Revised classification of the class Myxosporea Bütschli 1881. *Folia Parasitol. (Praha)* **31**: 193-205

MARGOLIS ML, KENT ML, BUSTOS P (1996)

Diseases of salmonids resembling myxosporean whirling disease, and the absence of *Myxosoma cerebralis*, in South America *Diseases of Aquatic Organisms* **25**, 33-37

MARQUÈS A (1984)

Contribution à la connaissance des Actinomyxidies: Ultrastructure, cycle biologique, systématique Languedoc. Université des Sciences et Techniques, Thèse de Doctorat d'Etat

MARKIW ME, WOLF K (1978)

Myxosoma cerebralis: fluorescent antibody techniques for antigen recognition. Journal of the Fisheries Research Board of Canada **35**, 828–832.

MARKIW ME, WOLF K (1983)

Myxosoma cerebralis (Myxozoa: Myxosporrea) etiologic agent of salmonid whirling disease requires tubificid worms (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle. J. Protozool. **30**: 561-564

MARKIW ME (1992)

Experimentally induced whirling disease. I. Dose response of fry adults of rainbow trout exposed to the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis*. J. Aquat. Anim. Health **4**:40-43

MATSUMOTO M, JAMMOTO G (1966)

On the seasonal rhythmicity of oviposition in the aquatic oligochaete *Tubifex hattai*. Japanese Journal of Ecology **16**: 134–139.

MEASURES LN (1988)

Epizootiology, pathology, and description of *Eutrongylides tubifex* (Nematoda: Dioctophymatoidea) in fish. Can. J. Zool. **66**: 2212-2222

MEASURES LN (1988)

The development and pathogenesis of *Eutrongylides tubifex* (Nematoda: Dioctophymatoidea) in piscivorous birds. Can. J. Zool. **66**: 2223-2232

MILBRINK G (1975)

Population biology of the cestode *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas) in bream, *Abramis brama* (L.) and the feeding of fish on oligochaetes. Rep. Inst. Freshwat. Res. Drottningholm **54**: 36-51

MILBRINK G (1993)

On the use of indicator communities of Tubificidae and some Lumbriculidae in the assessment of water pollution in Swedish lakes. Zoon **1**: 125-139

MUSTAPHA T, SEUSS J, JÖRGENSEN JB, HOFFMANN KH (1983)

Gluconeogenesis in facultative anaerobic invertebrate, evidence of oxal acetate decarbox. An anaerobic end product incorporated into glycogen from the tissues of *Tubifex sp.* Journal Comp. Physiol. Biochem. System. Environ. Physiol. **4(149)**: 477-484

MÜLLER OF (1774)

Vermium terrestrium et fluviatilium. Havniae et Lipsiae : Heineck et Faber

NEHRING RB, THOMPSON KG, TAURMAN K, ATKINSON W (2003)

Efficacy of passive sand filtration in reducing exposure of salmonids to the actinospore of *Myxobolus cerebralis*. Dis Aquat Organ. **57(1-2)**: 77-83

NICKUM D (1999)

Whirling Disease in the United States: A Summary of Progress in Research and Management. Trout Unlimited Januar 1999

O'GRODNICK JJ (1975)

Whirling disease *Myxosoma cerebralis* spore concentration using the continuous plankton centrifuge. J Wildl Dis **11(1)**: 54-7

PLEHN M (1905)

Über die Drehkrankheit der Salmoniden [*Lentospora cerebralis*, (Hofer) Plehn] Archiv für Protistenkunde **5**, 145-166

PODDUBNAYA TL (1971)

Resorption and regeneration of the reproductive system in *Isochaetides newaensis* Mich. (Oligochaeta, Tubificidae). Leningrad Izdat. "Nauka"

PODDUBNAYA TL (1984)

Parthenogenesis in tubificidae. Hydrobiologia **115**: 97-99

PUTZ RE, HOFFMAN GL (1966)

Transmission of *Myxosoma cerebralis* (whirling disease). Progre. Sport. Fish. Res. 1970, pp. 93-99

PUTZER V, GNAIGER E, LACKNER R (1985)

Flexibility of anaerobic metabolism in aquatic oligochaetes (*tubifex* sp.). Biochemical calorimetric changes induced by a deproteinised hydrolysate of bovine blood. Comparative Biochem. Physiol. **82**: 965-970

REYNOLDFSON TB (1987)

The role of environmental factors in the ecology of tubificid oligochaetes. An experimental study. Holarct. Ecol. **10**: 241–248

ROBBINS JA, KEILTY T, WHITE DS, EDDINGTON DN (1989)

Relationship among tubificid abundances, sediment composition and accumulation rates in Lake Erie. Can. J. Fish. aquat. Sci. **46**: 223–231

ROSE JD, MARRS GS, LEWIS C, SCHISLER G (2000)

Whirling Disease behaviour and its relation to pathology of brain stem and spinal cord in rainbow trout. J. Aquat. Anim. Health **12**:107-118

RYCE EK, ZALE AV, MACCONNELL E (2004)

Effects of fish age and parasite dose on the development of whirling disease in rainbow trout. Dis Aquat Organ. **59**(3): 225-33

SAUTER G (1995)

Bestimmungsschlüssel für die in Deutschland verbreiteten Arten der Familie Tubificidae mit besonderer Berücksichtigung von nicht geschlechtsreifen Tieren. Lauterbornia **23**:46-50

SCHÄPERCLAUS W (1931)

Die Drehkrankheit in der Forellenzucht und ihre Bekämpfung Zeitschrift für Fischerei **29**, 521-567

SCHÄPERCLAUS W (1990)

Fischkrankheiten. 5. Auflage, Akademie-Verlag, Berlin

SCHLEGEL M, LOM J, STECHMANN A, BERNHARD D, LEIPE D, DIKOVÀ I, SOGIN ML (1996)

Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: Evidence that Myxozoa are Metazoa related to the Bilateria.

Arch. Protistenkd. **147**: 1-9

SCHOTT A (2002)

Vergleichende Untersuchungen zur Wirksamkeit von Fumagillin und TNP-470 im Rahmen der Bekämpfung der Drehkrankheit bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) Diss. Vet. Med. Ludwig-Maximilians-Universität München

SEIDLMEIER UA, BOCK S, HOFFMANN KH (1987)

Die Verstoffwechslung von organischen Säuren nach parenteraler Aufnahme durch *Tubifex* sp., einen Süßwasseroligochaeten. Verh. Deutsch Zoologische Gesellschaft **80**: 226

SIDDALL ME, MARTIN DS, BRIDGE D, DESSER SS, CONE DK (1995)

The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria.

J. Parasitol. **81**(6): 671-7

SJOLIN E, ERSEUS C, KALLERSJO M (2005)

Phylogeny of Tubificidae (Annelida, Clitellata) based on mitochondrial and nuclear sequence data. Mol. Phylogenet. Evol. **35**(2): 431-41

SMOTHERS JF, VON DOHLEN CD, SMITH LH, SPALL RD (1994)

Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. Sciences **256** (5179): 1719-21

STEVENS R, KERANS BL, LEMMON JC, RASMUSSEN C (2001)

The effects of *Myxobolus cerebralis* myxospore dose on triactinomyxon production and biology of *Tubifex tubifex* from two geographic regions. J. Parasitol. **87**(2): 315-21

STURMBAUER C, OPADIYA GB, NIEDERSTATTER H, RIEDMANN A, DALLINGER R (1999)

Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance. *Mol. Biol. Evol.* **16**(7): 967-74

TIMM TE (1972)

Relation of geographic distribution of aquatic Oligochaeta to temperature. In: *Vodnye maloshchetinkovye chervil. Materialy vtorogo vsesoyuzn. Simp. Borok. 1972*, 124-12, Yaroslavl', Izdat. Akad. Nauk. SSSR

VINCENT D (1996)

Whirling Disease and wild trout: the Montana experience. *Fisheries (Bethesda)* **21**: 32-34

WALKER PG, NEHRING RB (1995)

An investigation to determine the cause(s) of the disappearance of young wild rainbow trout in the upper Colorado River in Middle Park, Colorado. Colorado Division of Wildlife Report, Denver

WAVRE M, BRINKHURST RO (1971)

Interactions between some tubificid oligochaete and the bacteria found in the sediments of Toronto Harbour, Ontario. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **28**: 335-341

WOLF K, MARKIW ME, MACHADO J, CRUZ M, GALHANO H, EIRAS J, HERMAN RL (1981)

Non-myxosporidan black tail of salmonids *Journal of Fish Diseases* **4**, 355-357

WOLF K, MARKIW ME (1982)

Myxosoma cerebralis: inactivation of spores by hot smoking of infected trout *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **39**, 926-928

WOLF K, MARKIW ME (1984)

Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Sciences* **255**: 1449-1452

WOLF K, MARKIW ME, HILTUNEN JK (1986)

Salmonid whirling disease: *Tubifex tubifex* (Müller) identified as the essential oligochaet in the protozoan life cycle. J. Fish Dis. **9**: 83-85

ZENDT JS, BERGERSEN EP (2000)

Distribution and abundance of the aquatic oligochaete host *Tubifex tubifex* for the salmonid whirling disease parasite *Myxobolus cerebralis* in the upper Colorado River basin. North America Journal of Fisheries Management **20**: 502-512

Anhang

Die folgenden Tabellen (a bis g) enthalten alle Ergebnisse der Sporenproduktion sowie die Temperaturschwankung im gesamten Versuchszeitraum.

Die Bezeichnungen 1A-10C beziehen sich auf die einzelnen Becken.

Tag X bezieht sich auf die Sporenzahl bzw. die Temperatur am Tag X nach der Infection.

Becken	Tag 108	Tag 115	Tag 122	Tag 124	Tag 128	Tag 138	Tag 142	Tag 145	Tag 149	Tag 152
1A	0	0	0	0	8	308	6000	3500	19200	14380
1B	0	0	0	0	0	12	6500	2400	4800	3500
2A	0	0	0	0	0	15	126000	71780	316000	254520
2B	0	0	0	0	0	4000	119000	74400	281400	173880
3A	0	0	0	12	0	0	9600	15600	50400	150400
3B	0	0	0	0	20	0	7000	6300	232800	216000
4A	0	14	0	0	5	21	36400	46200	163200	323100
4B	0	0	0	0	0	7	15600	16800	137600	109600
5A	0	0	0	0	0	0	14400	49580	227200	245560
5B	0	0	0	0	0	0	10500	10000	40800	24800
6A	0	0	0	0	0	0	11000	29400	34400	12800
6B	0	0	0	0	0	0	38	55	20000	50400
7A	0	0	0	0	0	0	55	63	150400	30960
7B	31	17	8	0	0	9	9600	39200	181600	187200
8A	0	10	4	7	4	13	13	30	5600	18400
8B	25	15	32	36	120	100	23	24	30	40
9A	0	0	3	35	42	49	30	20	6000	36900
9B	0	0	0	0	0	0	20	270	18600	71200
10A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhang a: TAM-Produktion aller Becken von Tag 108 bis Tag 152 post inf.

Becken	Tag 156	Tag 159	Tag 166	Tag 170	Tag 173	Tag 177	Tag 180	Tag 184	Tag 194	Tag 198
1A	19760	17300	15200	7200	1000	2600	4200	5600	5000	1000
1B	6600	5300	2400	10400	1600	1900	1300	3200	4000	1000
2A	427200	48900	604800	590800	259200	263600	249000	248000	50000	3000
2B	320400	315800	283300	232800	144800	132000	138600	125600	35000	51000
3A	124000	233000	306000	203200	170100	159000	171200	168000	70000	27000
3B	166400	240600	270900	315000	320000	269000	224000	156000	188000	116000
4A	244000	219600	192600	288000	304000	313000	321000	296000	105000	120000
4B	179200	168400	105300	216000	200000	230000	254000	248000	130000	150000
5A	80000	160500	211500	261000	256000	242000	237000	232000	230000	146000
5B	84800	97900	121500	130500	130000	146000	123000	128000	180000	178000
6A	14400	31600	42300	137700	153000	143000	121000	96000	50000	59000
6B	51200	43800	40500	45000	32000	36000	41000	48000	80000	72000
7A	184000	210700	275400	315000	272000	257000	244000	272000	70000	60000
7B	160000	200800	266400	269100	312000	298000	259000	232000	210000	170000
8A	8000	32300	36000	31500	30600	120000	256000	311000	145000	135000
8B	32	176700	288000	306000	288000	271000	328000	296000	124000	99000
9A	11200	43600	60300	72000	72000	120000	143000	168000	10000	20000
9B	32000	57200	85500	99000	135000	154000	243000	283200	99000	120000
10A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhang b: TAM-Produktion aller Becken von Tag 156 bis Tag 198 post inf.

Becken	Tag 205	Tag 208	Tag 215	Tag 222	Tag 226	Tag 229	Tag 236	Tag 240
1A	40	20	41	43	15	5	0	0
1B	100	6	13	31	10	2	0	0
2A	37600	38400	43200	4700	4000	5300	255	210
2B	40800	34400	53000	5600	75000	49000	2000	2300
3A	11200	13600	32900	84000	99000	47000	530	780
3B	37600	4000	43600	71200	74000	61000	4000	3500
4A	7200	6400	19400	21300	19000	15800	107	360
4B	5600	10400	27100	46900	50000	45600	1000	780
5A	67200	26400	82000	804000	74000	56400	492	254
5B	32800	25600	69000	85000	87000	39200	230	257
6A	22400	16000	39000	65000	61000	21700	145	236
6B	2400	4000	11400	21000	26000	17400	117	68
7A	8800	12000	31800	42000	46000	3800	382	218
7B	9600	14400	19200	17000	4000	2640	95	54
8A	22400	24800	36900	64000	62000	32600	2000	1600
8B	54400	45600	109300	115000	56000	43500	1000	1200
9A	15200	14400	36000	40600	77000	96300	3000	2300
9B	12000	10400	27000	31800	29000	14200	787	470
10A	0	0	0	0	0	0	0	0
10B	0	0	0	0	0	0	0	0
10C	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhang c: TAM-Produktion aller Becken von Tag 205 bis Tag 240 post inf.

Becken	Tag 108	Tag 115	Tag 122	Tag 124	Tag 128	Tag 138	Tag 142	Tag 145	Tag 149	Tag 152
1A	8,00	9,00	8,00	9,00	10,00	10,00	10,00	9,00	12,00	14,00
1B	8,00	9,00	8,00	9,00	10,50	10,00	10,00	9,00	12,00	13,50
2A	10,00	11,00	10,00	11,00	12,00	11,50	11,50	11,00	14,00	14,50
2B	8,00	9,00	8,00	9,00	10,50	10,00	10,00	9,00	12,50	14,00
3A	9,00	10,00	8,50	9,50	11,00	10,50	11,00	10,00	13,00	14,00
3B	7,00	8,00	7,00	8,50	9,00	9,00	9,00	8,00	11,00	12,00
4A	9,00	10,00	9,00	10,00	11,00	11,00	11,00	10,00	13,00	14,00
4B	8,00	8,00	7,00	8,00	10,00	9,00	9,50	9,00	11,50	12,00
5A	10,00	10,50	10,00	10,00	12,00	11,00	12,00	11,00	13,50	14,00
5B	7,50	9,00	7,00	9,00	10,50	10,00	10,00	9,50	12,00	13,50
6A	7,00	9,00	8,00	9,00	10,50	10,00	10,00	9,50	12,00	13,00
6B	8,00	9,00	8,00	8,00	10,50	10,00	10,00	10,00	12,00	13,00
7A	8,00	8,00	7,00	8,00	10,00	9,00	9,50	9,00	11,50	12,00
7B	9,00	9,50	8,50	9,00	11,00	10,00	10,50	10,00	12,50	13,00
8A	8,00	9,00	7,00	8,50	10,00	9,00	10,00	9,00	11,00	12,00
8B	7,00	8,00	7,00	8,00	9,50	9,00	9,50	9,00	11,00	11,50
9A	8,00	8,50	7,50	8,50	10,00	9,00	10,00	9,00	11,00	12,00
9B	7,00	8,00	7,00	8,00	9,50	9,00	9,50	9,00	10,50	11,50
10A	8,00	8,50	7,50	8,00	9,50	9,00	9,50	9,00	11,00	11,00
10B	8,00	8,00	7,50	8,00	9,50	9,00	9,50	9,00	11,00	11,00
10C	7,00	7,50	6,50	7,00	8,50	8,00	9,00	8,50	10,00	10,00

Anhang d: Temperaturaufzeichnung aller Becken von Tag 108 bis Tag 152

Becken	Tag 156	Tag 159	Tag 166	Tag 170	Tag 173	Tag 177	Tag 180	Tag 184	Tag 194	Tag 198
1A	14,00	14,50	13,00	13,00	16,00	15,00	12,00	13,00	14,50	16,00
1B	14,00	14,00	13,00	13,00	14,00	15,50	12,00	12,00	15,00	16,50
2A	15,00	15,00	14,50	14,50	11,00	16,50	13,50	14,00	16,00	17,50
2B	14,00	14,50	13,00	13,00	15,00	16,00	12,00	14,00	15,00	17,00
3A	14,00	15,00	13,50	14,00	15,00	16,00	13,00	14,00	15,00	17,00
3B	12,00	13,00	11,00	11,50	14,00	16,00	11,00	12,00	14,00	17,50
4A	14,00	15,00	13,00	13,50	15,50	15,50	12,50	14,00	15,00	16,00
4B	13,00	14,00	12,00	12,50	14,00	16,00	11,50	13,00	14,50	16,50
5A	15,00	15,50	14,00	14,00	16,00	16,50	13,50	15,00	16,00	17,00
5B	14,00	14,50	12,50	13,00	15,00	16,00	12,00	14,00	15,00	16,50
6A	13,00	14,00	12,50	13,00	15,00	15,00	12,00	13,00	15,00	16,00
6B	13,00	14,00	13,00	13,00	14,50	15,00	12,50	13,50	15,00	16,50
7A	12,50	13,50	11,50	12,00	15,00	15,00	11,50	13,00	14,00	16,00
7B	13,50	14,50	13,00	13,00	14,00	16,00	13,50	14,00	15,00	17,00
8A	12,00	13,00	12,00	12,00	14,00	14,00	12,00	12,50	14,00	16,00
8B	12,00	13,00	11,50	12,00	14,00	14,00	11,00	12,50	14,00	16,00
9A	12,50	13,00	12,00	12,00	14,00	14,00	12,00	13,00	14,00	16,00
9B	12,00	13,00	11,00	12,00	14,00	14,00	11,50	12,00	14,00	15,00
10A	12,00	12,50	11,50	12,00	13,50	13,50	11,50	12,00	14,00	15,00
10B	12,00	12,50	11,50	12,00	13,50	14,00	11,50	12,00	14,00	15,00
10C	11,00	12,00	11,00	11,50	13,00	13,00	11,00	11,50	14,00	15,00

Anhang e: Temperaturaufzeichnung aller Becken von Tag 108 bis Tag 152

Becken	Tag 205	Tag 208	Tag 215	Tag 222	Tag 226	Tag 229	Tag 236	Tag 240
1A	16,50	17,00	18,00	18,00	18,00	19,00	18,50	18,50
1B	16,00	16,50	17,00	18,00	18,00	18,50	19,00	19,00
2A	10,00	17,00	16,50	17,00	17,00	18,00	18,00	19,00
2B	17,00	17,00	17,00	17,00	16,50	18,00	18,00	18,50
3A	16,50	17,00	18,00	18,50	18,50	19,50	19,00	19,00
3B	17,00	17,00	16,50	17,00	17,00	18,00	19,00	18,50
4A	17,00	17,00	18,00	18,00	18,00	19,00	18,50	19,00
4B	17,00	16,50	17,00	18,00	18,00	18,50	19,00	19,00
5A	18,00	18,00	18,50	19,00	19,50	20,00	19,50	20,00
5B	17,00	17,00	17,50	18,50	19,00	19,50	19,00	19,00
6A	17,00	17,00	17,00	18,00	18,00	18,00	18,00	19,00
6B	16,50	16,50	16,00	16,50	17,00	18,00	18,00	18,50
7A	17,00	16,00	16,00	17,50	18,00	19,00	19,00	19,00
7B	17,00	17,00	17,50	18,00	18,00	18,50	19,00	19,00
8A	17,00	16,50	16,50	17,00	17,50	18,00	19,00	19,00
8B	16,50	16,00	16,00	17,50	18,00	18,00	18,00	18,50
9A	17,00	16,00	16,00	17,00	17,00	17,50	18,00	19,00
9B	16,00	15,00	16,00	17,00	17,00	17,50	18,00	19,00
10A	16,00	15,00	15,50	17,50	17,50	18,00	19,00	19,00
10B	16,00	15,00	16,00	18,00	18,00	19,00	19,00	19,00

Anhang f: Temperaturaufzeichnung aller Becken von Tag 205 bis Tag 240

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
bzw.	Beziehungsweise
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonucleid Acid (engl.)
et al.	et altera (Latein)
g	Gramm
i.e.	id est (Latein)
IE	Internationale Einheit
IFAT	Immunfluoreszenzantikörpertechnik
kg	Kilogramm
l	Liter
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification
m	Meter
<i>M. cerebrialis</i>	<i>Myxobolus cerebrialis</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
<i>O. mykiss</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
post exp.	post expositionem (Latein)
post inf.	post infectionem (Latein)
sp.	Spezies (singular)
SPF	Spezifisch pathogenfrei
spp.	Spezies (plural)
<i>T. tubifex</i>	<i>Tubifex tubifex</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tri-Acetat EDTA
TAM	Triactinomyxom
UV	Ultra Violet

z.B.	Zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Danksagung

Als erstes möchte ich mich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die gute Betreuung und die Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit bei Prof. Dr. Mansour El-Matbouli bedanken.

Daniel Grabner und Dr. Dennis Kallert danke ich für die Korrektur und die kritische Auseinandersetzung mit dem Thema und die neuen Argumente.

Christoph Dörfler, Dr. Edith Eszterbauer, Daniel Grabner, Dr. Dennis Kallert, Simone Keller, Dr. Amine Oucible, M'hamed Oumouna, Ute Rucker, Nina Seel, Dr. Hatem Soliman und Dr. Vanessa Severin danke ich ganz herzlich für die freundliche Teamarbeit sowie die hilfreiche Unterstützung.

Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. H. Küchenhoff und seinem Mitarbeiter Dr. David Rummel für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Den Institutsmitarbeitern, die mir bei der Durchführung dieser Doktorarbeit geholfen haben, möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen – insbesondere Christine Kühnhauser-Vogt und Verena für die Einarbeitung in die histologischen Arbeitsmethoden. Unser Fischwirt André Hohenegger für seine Hilfe bei dem Versuchsaufbau.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden für ihre Unterstützung und die Ablenkung an geeigneter Stelle bedanken.

Lebenslauf

Name: Yatiemene Hamed Kalamourou Coulibaly

Geburtsdatum: 29.10.1974

Geburtsort: Korhogo(Côte d'Ivoire)

Eltern: Idrissa Coulibaly
Rokia Traoré

Schulbildung: 1981-1987 Mission Catholique in Korhogo
1987-1991 Collège d'enseignement général in Korhogo
1991-1994 Lycée moderne in Korhogo

Studium: 1994-1997 Chemie Biologie Geologie Universität
Abobo-Adjamé in Abidjan(Côte d'Ivoire)
1997-1998 Sprachkurs bei der DAG in Bremen
1998-1999 Chemie an der Universität Bremen
1999-2005 Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians
Universität in München
Abschluss des III. Abschnitts der Tierärztlichen Prüfung
am 14.02.2005
Approbation am 09.12.2005

Promotionsstudium: Seit März 2005 am Institut für Zoologie,
Fischereibiologie und Fischkrankheiten der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München