



## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	v
Tabellenverzeichnis .....	vi
Abkürzungsverzeichnis .....	vii
1. Einleitung und Problemstellung .....	1
2. Theoretischer Teil.....	2
2.1 Parasiten.....	2
2.2 Nematoden .....	3
2.2.1 Anisakis simplex .....	3
2.2.2 Andere Arten der Familie der Anisakidae .....	6
2.3 Anisakiasis .....	7
2.4 Gesetzliche Aspekte.....	8
3. Material und Methoden .....	12
3.1 Material.....	12
3.1.1 Fisch .....	12
3.1.2 Chemikalien .....	12
3.1.2.1 Pepsin.....	12
3.1.2.2 Salzsäure .....	13
3.1.3 Schüttelwasserbad .....	13
3.2 Methoden zum Nachweis von Nematodenlarven .....	14
3.2.1 Durchleuchtung .....	14
3.2.2 Digestion .....	14
3.2.3 Schüttelwasserbadverfahren.....	15
4. Durchführung .....	16
4.1 Vorbereitung der Hauptversuche .....	16
4.2 Vorversuche .....	18
4.2.1 Messung vier Mal alle zwei Stunden .....	19
4.2.2 Messung nach 14 Stunden/ Messung nach 14 Stunden mit dreißigminütiger Nachverdauung .....	20
4.3 Tests .....	21
4.3.1 Tests am Magnetrührer .....	21

4.3.2 Tests am SWB.....	22
4.4 Hauptversuche .....	23
4.4.1 Hauptversuch I am SWB.....	23
4.4.2 Hauptversuche I am Magnetrührer.....	23
4.4.3 Hauptversuche II am SWB.....	24
5. Ergebnisse und Diskussion.....	24
5.1 Vorversuche .....	24
5.1.1 Vorversuch I: Unterschiedliche Verhältnisse Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung bei einer Rückstandsmessung vier Mal alle zwei Stunden.....	25
5.1.2 Vorversuch III: Wiederholung des optimalen Verhältnisses aus Vorversuch I .....	26
5.1.3 Vorversuch II: Unterschiedliche Verhältnisse Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung bei 14-stündiger Digestion.....	27
5.1.4 Vorversuch IV: Einfluss von Rührfischen .....	28
5.1.5 Vorversuch V: Verlängerte Digestionszeit SWB.....	29
5.1.6 Vorversuch VI: Einfluss Nachverdauung .....	30
5.1.7 Vorversuch VII: Einfluss Nachverdauung auf die Ganzheit gefrorener NL.....	30
5.1.8 Vorversuch VIII: Einfluss des Rührfisches auf die Ganzheit gefrorener NL .....	31
5.1.9 Stabilität von tiefgefrorenen NL in Abhängigkeit von der Digestionstemperatur ...	31
5.2 Tests .....	35
5.2.1 Tests am Magnetrührer .....	35
5.2.2 Tests am SWB.....	36
5.3 Hauptversuche .....	37
5.3.1 Hauptversuch I am SWB: Digestion von gespikten Forellenfilets bei 37 °C über 14 Stunden mit anschließender Nachverdauung.....	37
5.3.2 Hauptversuche I am Magnetrührer.....	38
5.3.2.1 Digestion von gespikten Forellenfilets bei 30 °C über 2 Stunden.....	38
5.3.2.2 Digestion von gespikten Lachsfilets bei 30 °C über 2 Stunden .....	39
5.3.3 Hauptversuche II am SWB.....	40
5.3.3.1 Digestion von gespikten Forellenfilets bei 30 °C über 14 Stunden mit anschließender Nachverdauung.....	40
5.3.3.2 Digestion von gespikten Lachsfilets bei 30 °C über 14 Stunden mit anschließender Nachverdauung.....	41
5.3.4 Abschließende Bemerkungen zu den Hauptversuchen .....	41

6. Schlussfolgerung .....	43
7. Zusammenfassung .....	46
8. Abstract.....	48
9. Quellenverzeichnis .....	50
10. Anhang .....	i
10.1 Zusammenfassung Ergebnisse SWB .....	i
10.2 Zusammenfassung Ergebnisse Magnetrührer .....	iii
10.3 Sicherheitsdatenblatt Pepsin .....	iv
10.4 Sicherheitsdatenblatt Salzsäure.....	vi
10.5 Nachweis von Nematoden durch Durchleuchtung .....	ix
10.6 Nachweis von Nematodenlarven im Muskelfleisch durch Verdauung.....	xiii

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Life-cycle of <i>Anisakis</i> species (Quelle: Huss und Embarek, P. K. B. 2004: 62) .4	4
Abbildung 2: Abbildungen von <i>Anisakis simplex</i> (li.: Anterior, re.: Posterior) (Quelle: eigene Bilder) .....	5
Abbildung 3: typisch eingerollte Form des <i>Anisakis simplex</i> (Quelle: eigene Bilder).....	5
Abbildung 4: verwendetes SWB (Quelle: eigenes Bild) .....	14
Abbildung 5: verwendete Magnetrührer (Quelle: eigenes Bild) .....	22
Abbildung 6: SWB-Digestion bei Vorversuch I (Messung vier Mal alle zwei Stunden): 100 g Heringsfilet in Abhängigkeit zu der Menge der Digestionslösung.....	26
Abbildung 7: SWB-Digestion bei Vorversuch III (Messung vier Mal alle zwei Stunden): 100 g Heringsfilet in Abhängigkeit zu der Menge der Digestionslösung.....	27
Abbildung 8: unterschiedliche Rührfische (li.: ovale Rührfische für Digestionsversuche mit SWB, re.: länglich, eckiger Rührfisch für Digestionsversuche mit Magnetrührer) (Quelle: eigene Bilder).....	29
Abbildung 9: Vergleich des Einflusses lebender und toter NL auf die Ganzheit nach der Digestion in Prozent.....	33
Abbildung 10: Rückstandsmenge und WFR ganzer NL bei den Vorversuchen II, IV und V in Abhängigkeit zu den Versuchsbedingungen im Mittelwert und Standardabweichung der Rückstandsmenge.....	34
Abbildung 11: Rückstandsmenge und WFR ganzer NL bei den Vorversuchen VI, VII und VIII in Abhängigkeit zu den Versuchsbedingungen im Mittelwert und Standardabweichung der Rückstandsmenge.....	35
Abbildung 12: Anzahl gefundener gefrorener NL aus Versuchen mit Magnetrührer an Forellenfilet.....	39
Abbildung 13: Anzahl gefundener gefrorener NL aus Versuchen mit Magnetrührer an Lachsfilet.....	39
Abbildung 14: Vergleich Rückstandsmenge und WFR ganzer NL in % für Hauptversuche ..	43

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Forellenfiletproben für die Hauptversuche – Anzahl der zugefügten NL.....	17
Tabelle 2: Lachsfiletproben für die Hauptversuche – Anzahl der zugefügten NL.....	18
Tabelle 3: unterschiedliche Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung.....	28
Tabelle 4: WFR ganzer NL in % in Abhängigkeit zur Temperatur bei Forellen- und Kabeljaufilets.....	32

## Abkürzungsverzeichnis

ALS	Arbeitskreis Lebensmittelchemischer Sachverständiger
ALTS	Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene und der vom Tier stammenden Lebensmittel tätigen Sachverständigen
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
HCl	Salzsäure (systematischer Name: Chlorwasserstoffsäure)
HV	Hauptversuch/e
NL	Nematodenlarven
P	Prüfgefäß
rpm	revolutions per minute (dt.: Umdrehungen pro Minute)
SWB	Schüttelwasserbad
VV	Vorversuch/e
WFR	Wiederfindungsrate

## 1. Einleitung und Problemstellung

Marine Fische werden häufig von Nematodenlarven, auch Fadenwürmer genannt, parasitär befallen. Besonders häufig treten der *Anisakis simplex* und der *Pseudoterranova decipiens* auf. Für den Verbraucher haben die beiden genannten Nematodenarten eine lebensmittelhygienische Bedeutung. Durch den Verzehr roher oder unzureichend zubereiteter infizierter Fischprodukte besteht ein gewisses Risiko für die Gesundheit des Menschen, weil er auf diese Weise an Anisakiasis erkranken kann. Somit zählt diese Krankheit zu den Zoonosen, was bedeutet, dass es sich um eine Infektionskrankheit handelt, welche wechselseitig zwischen Mensch und Tier übertragen wird. Aus diesem Grund hat zum einen die Europäische Union zum Schutz der Verbraucher mehrere Verordnungen erlassen. Zu nennen sind dabei die Verordnungen Nr. 853/2004, Nr. 854/2004 und Nr. 2074/2005. In diesen werden spezifische Hygiene- und Verfahrensvorschriften für die Überwachung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs bestimmt (Europäische Union 2004a; Europäische Union 2004b; Europäische Union 2005). Zum anderen hat die Codex Alimentarius Kommission, welche sich aus der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation (FAO) und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zusammensetzt, mehrere Standards für konservierte, tiefgekühlte oder getrocknete Fischereiprodukte festgelegt. Dazu zählen die Standards Codex STAN 165 und 190 aus dem Jahr 1995 und Codex STAN 244 aus dem Jahr 2004 (Codex Alimentarius Commission o.J.a).

Um parasitär eingewanderte Nematodenlarven im Fischmuskel quantitativ nachzuweisen, wird häufig die Digestionsmethode angewandt. Dies bedeutet, dass zerkleinertes Muskelfleisch mit einer Pepsin-Salzsäure (HCl)-Lösung versetzt und anschließend über einen bestimmten Zeitraum durch stetiges Rühren verdaut wird. Das Prinzip der Digestion gemäß Codex Standard 244-2004 Annex I bringt jedoch das Problem mit sich, dass tiefgefrorene Anisakilarven häufig zu Bruchstücken zerfallen, wodurch die quantitative Erhebung und nachfolgende Auswertung erschwert wird. Aus diesem Grund soll eine neue Methode mithilfe eines Schüttelwasserbads (SWB) entwickelt und getestet werden, um Anisakilarven im Ganzen nachweisen zu können.

Für Institutionen wie zum Beispiel nationale Referenzlaboratorien oder Untersuchungsämter, die mithilfe der Digestionsmethode gemäß Codex Standard 244-2004 Annex I Nematodenlarven in gefrorenen Fischfilets nachweisen müssen, könnte die neu entwickelte Digestionsmethode unter Verwendung eines Schüttelwasserbads einige Vorzüge aufweisen.



Um statistisch verwertbare Aussagen treffen zu können, wird eine bestimmte Anzahl von Proben für die Hauptversuche vorbereitet, um die Methode mithilfe eines Magnetrührers und die Durchführung anhand eines Schüttelwasserbads miteinander vergleichen zu können.

## **2. Theoretischer Teil**

### **2.1 Parasiten**

Als Parasiten, auch „Schmarotzer“ genannt, werden Lebewesen bezeichnet, die in oder auf anderen Lebewesen, den sogenannten Wirten, leben und sie als Nahrungsquelle missbrauchen. Der Wirt wird ohne dessen unmittelbaren Tod geschädigt und zieht aus dieser Beziehung keinerlei Nutzen (Bilsing et al. 2004a: 314; Bilsing et al. 2004b: 401). Parasiten beeinflussen ihren Wirt negativ „durch Stoffentzug, Zerstörung von Geweben oder die Abgabe von giftigen Stoffen“ (Bilsing et al. 2004b: 401). Der Wirtsorganismus wird nicht nur als Nahrungsquelle genutzt, sondern ist häufig auch der Lebensraum des Parasiten, welcher sich in der Mehrzahl der Fälle dort weiterentwickelt und fortpflanzt (Hiepe 2006: 6). Besonders typisch ist das Parasitieren auf mehreren Wirtsarten, die im Laufe ihres Lebenszyklus besiedelt werden. Nicht selten ist der Wirtswechsel mit einem Generationswechsel verbunden (Probst und Schuchardt 2004: 314f).

Parasiten können nach dem Aufenthaltsort im oder am Wirt unterschieden werden. Leben die Parasiten innerhalb eines Wirtes werden sie als Endoparasiten (z.B. Bandwürmer) bezeichnet, leben sie außerhalb des Wirts als Ektoparasiten (z.B. Läuse). Auch die Dauer der Wirtsabhängigkeit kann unterschieden werden. So nutzen z.B. Flöhe den Wirt nur zeitweilig (temporär), z.B. zur Nahrungsaufnahme. Hingegen sind Läuse während ihres Lebens dauerhaft (permanent) an einen Wirt gebunden (Bilsing et al. 2004b: 401). Es gibt jedoch auch Parasiten, die nicht in allen Entwicklungsstadien parasitisch leben. Diese werden als „periodische Parasiten“ bezeichnet. Das Gegenteil sind sogenannte „permanente Parasiten“ (Eckert et al. 2008: 6).

Ähnlich wie die Parasiten werden die Wirte in unterschiedliche Kategorien eingeteilt. Mit zu den bedeutsamsten Kategorien gehören Endwirt, Zwischenwirt und Fehlwirt. Im Endwirt, auch als Definitivwirt bezeichnet, kommt es zur Entwicklung geschlechtlicher Stadien. Der Zwischenwirt, der ebenso als Intermediärwirt bekannt ist, ist ein „Wirt, in dem ein Parasit obligat einen Teil der Entwicklung durchlaufen muss und sich dabei ungeschlechtlich vermehren kann“ (Eckert et al. 2008: 7). Der Fehlwirt hingegen, der auch aberranter Wirt genannt wird, ist ein Wirt, in oder an dem sich der Parasit nicht weiter entwickeln kann (ebd.).

## 2.2 Nematoden

Nematoden, auch als Fadenwürmer bekannt, sind meist lang gestreckte, ungegliederte, faden- oder spindelförmige Würmer mit einem runden Querschnitt und einer hell-durchscheinenden, weißlichen Farbe. Die Mehrzahl der Arten ist getrenntgeschlechtlich, wobei die Weibchen meist größer als die Männchen sind (Priebe 2007: 268f).

Die Nematoden stehen für einen Stamm mit mehr als 26.000 bekannten Arten, die die unterschiedlichsten Biotope besiedeln und sich zum Teil an extreme Bedingungen angepasst haben (Tenter und Schnieder 2006: 68). So gibt es Arten, die im Meer- und Süßwasser, im Erdreich, in heißen Quellen, in der Tiefsee (bis zu 6000 m Tiefe) oder in verrottendem organischem Material leben. Viele Nematodenarten besiedeln Pflanzen, Tiere und Menschen parasitär (Priebe 2007: 269).

Die Nematoden werden von einer dreischichtigen äußeren Körperdecke, der Kutikula umschlossen, welche aus kollagenhaltigen und sklerotisierten Proteinen besteht (Mehlhorn 2001: 115). Äußerlich weisen die Nematoden keine Zonierung auf. Die Körperwand wird neben der Hypodermis aus einer Schicht von schräggestreiften Längsmuskelzellen gebildet. Darunter befindet sich eine primäre Leibeshöhle, welche flüssigkeitsgefüllt ist. Die schlangenähnliche Körperbewegung der Nematoden kommt auf der einen Seite durch das Gegenspiel der starren Oberfläche und des Drucks der Flüssigkeiten (sogenannter Turgordruck) in der Leibeshöhle und auf der anderen Seite durch die Kontraktionen der Längsmuskelzellen zustande (ebd.).

Der Lebenszyklus der Nematoden erfolgt vom Ei über vier festgelegte Häutungen der Kutikula (L1-L4) hin zu geschlechtsreifen Würmern. Das infektiöse Stadium bei parasitischen Arten ist für den Endwirt i.d.R. die Drittlarve (Priebe 2007: 269). Die befruchteten Eizellen sind von einer sklerotisierenden, oft chitinhaltigen Schale umgeben, die ein Überleben im Freien ermöglicht. Die Größe dieser Eier beträgt meist 50-100 µm und ist nicht von der Länge des Weibchens abhängig (Mehlhorn 2001: 119).

### 2.2.1 *Anisakis simplex*

*Anisakis simplex* gehört zur Familie der Anisakidae (Eckert et al. 2008: 149). Die Arten dieser Familie haben eine große lebensmittelhygienische Bedeutung, da ein gewisses Risiko der Gesundheitsgefährdung des Menschen beim Verzehr von Fischen besteht.

Der Entwicklungszyklus von *Anisakis simplex*, welcher in Abbildung 1 bildlich dargestellt ist, läuft wie folgt ab: Die adulte Form (L4) lebt im Magen-Darmtrakt von Meeressäugern. Sehr häufig sind Wale (Blauwal, Zwergwal, Delphin u.a.), seltener Robben betroffen (Eckert et al.

2008: 323). Da vorwiegend Wale als Endwirte befallen sind, wird *Anisakis simplex* auch als „Walwurm“ bezeichnet. Die marinen Säugetiere setzen die nicht embryonierten Eier mit den Fäzes ins Wasser ab. Im Wasser kommt es anschließend häufig zur Bildung der L1 und L2 Larven (Mehlhorn und Piekarski 2002: 340). Die geschlüpften Larven werden von ersten Zwischenwirten, wie Crustaceen (Krebse, Garnelen) aufgenommen und wachsen bis etwa 20 mm heran (L3). Es ist wahrscheinlich, dass Copepoden (Ruderfußkrebse) als Transportwirte dienen. Werden nun infizierte Zwischen- oder Transportwirte von Fischen verzehrt, wandern die Larven in deren Leibeshöhle über und kapseln sich zwischen den Eingeweiden, in der Leber und selten ebenfalls in der Muskulatur, ein (Eckert et al. 2008: 323). Die Fische dienen dabei lediglich als Stapelwirte. Das bedeutet, dass es zu keiner Weiterentwicklung der Larve kommt. Zudem können Raubfische die parasitierten Fische verzehren, sodass diese zusätzlich als Stapelwirt verwendet werden (Krauss et al. 2004: 473). Fressen die Endwirte infizierte Zwischenwirte, siedeln sich die Nematoden direkt im Magen oder Darm der Meeressäuger an und entwickeln sich zur Geschlechtsreife, womit sich der Zyklus schließt (Eckert et al. 2008: 323).

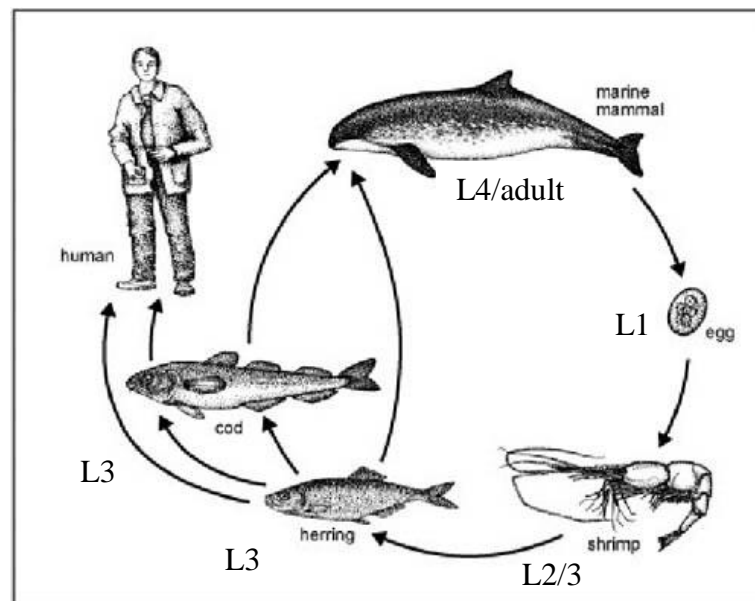


Abbildung 1: Life-cycle of *Anisakis* species (Quelle: Huss und Embarek, P. K. B. 2004: 62)

Obwohl der Großteil der *Anisakis*-Larven in die Eingeweide wandert und sich dort einkapselt, können auch Teile dieser Larven im Bauchlappen oder im Seitenmuskel zu finden sein (Pribe 2007: 293).

Die Männchen des *Anisakis simplex* weisen im adulten Stadium eine Länge von 3-13 cm auf. Die Weibchen können im Vergleich etwas größer werden. Die Spanne reicht hier von 4-20 cm (Eckert et al. 2008: 323).

Die Anisakis-Larve im dritten Entwicklungsstadium kommt gerade einmal auf eine Körperlänge von etwa 5-38 mm (Priebe 2007: 289). Der Larvenkörper ist weißlich und relativ transparent. Unter dem Mikroskop lässt sich der länglich verlaufende Ventrikel (Magen) als leicht verdickter Darmabschnitt erkennen (ebd.).

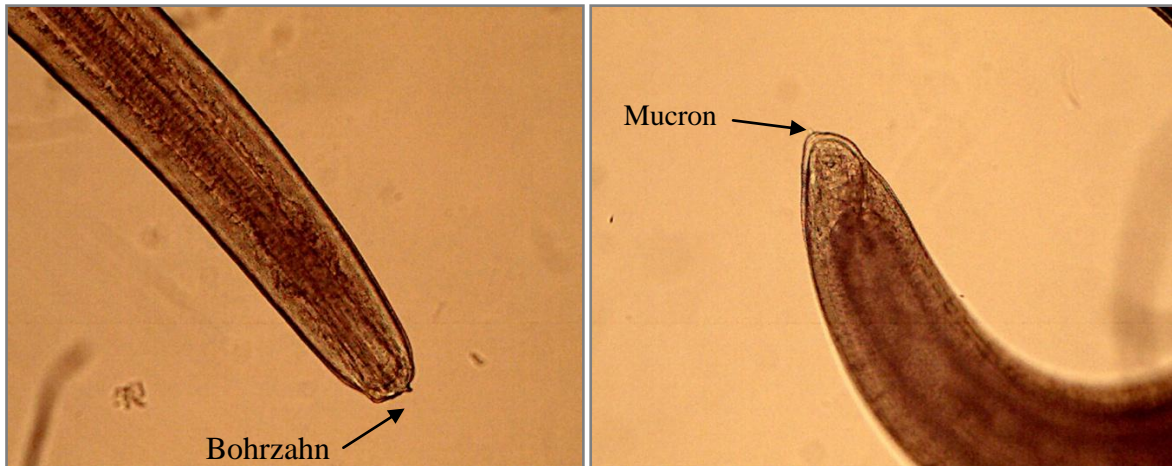


Abbildung 2: Abbildungen von *Anisakis simplex* (li.: Anterior, re.: Posterior) (Quelle: eigene Bilder)

Am Kopf befindet sich ein Bohrzahn, welcher in Abbildung 2 im linken Bild ersichtlich ist, und die eher unauffällige Ausgangsöffnung des Exkretions-/ Sekretionsorgans. Der vordere Teil wird als Anterior, der Hintere als Posterior bezeichnet. Am hinteren Ende sitzt seitlich der Enddarm. *Anisakis simplex* läuft zum Ende hin spitz zu. Dort ist eine spitzkegelige Auffaltung der Kutikula, das sogenannte Mucron, deutlich abgesetzt, welches in der Abbildung 2 im rechten Bild zu sehen ist (Priebe 2007: 290).

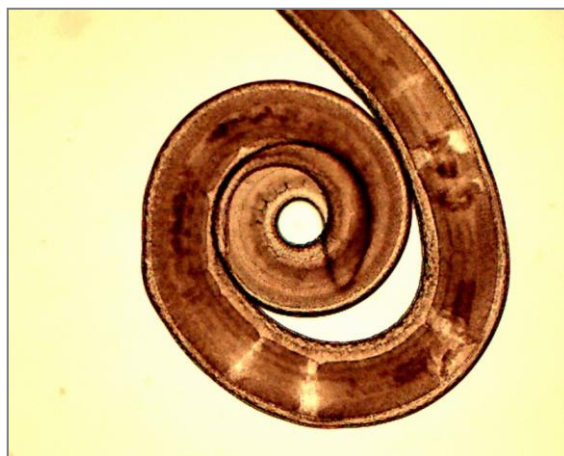


Abbildung 3: typisch eingerollte Form des *Anisakis simplex* (Quelle: eigene Bilder)

Die Larve ist eingerollt und von einer dünnen, bindegewebigen Kapsel (Gewebe, das vom Wirt aufgrund einer Immunreaktion gebildet wird) umgeben (Priebe 2007: 291). Abbildung 3

zeigt die typisch eingerollte Form, in der *Anisakis simplex* überwiegend auftritt. Die Anisakis-Larven liegen meist knäuelartig zusammen, sind jedoch leicht verschiebbar und miteinander verklebt (Priebe 2007: 285).

*Anisakis simplex* war im Jahr 1987 Auslöser für den sogenannten „Nematodenskandal“. Das Magazin „Monitor“ berichtete über Larven im Muskelfleisch von Seefischen. Infolgedessen brach der Absatz von Seefischen rapide ein. Im Vergleich zum Vorjahr waren es 83.000 Tonnen weniger. Zudem musste der Großmarkt in Bremerhaven auf Kurzarbeit umgestellt werden und nur durch den Einsatz von Beträgen in Millionenhöhe konnte die Bundesregierung den damaligen Zusammenbruch der Fischindustrie verhindern (Kepplinger 2008: 346).

### **2.2.2 Andere Arten der Familie der Anisakidae**

Neben *Anisakis simplex* sind drei weitere Gattungen der Familie der Anisakidae vorrangig verantwortlich für die Erkrankung an Anisakiasis, welche im nachfolgenden Kapitel genauer erläutert wird. Dazu gehören der häufig im Kabeljau vorkommende *Pseudoterranova decipiens*, *Hysterothylacium* und *Contracaecum*.

*Pseudoterranova decipiens* erreicht im Larvenstadium eine Länge von 25-60 mm und eine Dicke von 0,3-1,2 mm (Huss und Embarek, P. K. B. 2004: 62). Im adulten Stadium ist er 7-9 cm lang (Priebe 2007: 271). Somit ist dieser nicht nur deutlich länger als *Anisakis simplex*, sondern kann im Durchmesser auch dicker werden. *Pseudoterranova decipiens* tritt anders als *Anisakis simplex* in gerader oder in S-Form auf und ist leicht bräunlich bis rötlich gefärbt (Huss und Embarek, P. K. B. 2004: 62).

Das für die Unterscheidung verschiedener Gattungen wichtige Mucron ist wie bei *Anisakis simplex* deutlich abgesetzt, jedoch kommt es aufgrund der eindeutigen und mit bloßem Auge gut sichtbaren Erscheinungsmerkmale von *Pseudoterranova decipiens* zu keiner Verwechslungsgefahr (Priebe 2007: 297).

Als Endwirt sind fast ausschließlich Robben befallen, weswegen *Pseudoterranova decipiens* auch als „Robbenwurm“ bezeichnet wird. Der Entwicklungszyklus entspricht weitestgehend dem des *Anisakis simplex*. Eine wichtige Abweichung ist jedoch, dass die Larve im dritten Stadium nicht in die Leibeshöhlenorgane der als Zwischenwirt genutzten Knochenfische wandert, sondern überwiegend im Seitenmuskel zu finden ist und dabei die Rückenpartien bis hinter den Kopf erreicht. Dies stellt einen bedeutsamen Unterschied für die Fischwirtschaft dar, jedoch sind die relativ großen *Pseudoterranova*-Drittlarven wesentlich auffälliger und

einfacher im Fischmuskel zu erkennen als die kleineren, weißlichen *Anisakis simplex*-Larven (ebd.).

Auch die Gattungen *Hysterothylacium* und *Contracaecum* sollten bei der Diagnostik von Anisakiasis bedacht werden, obwohl beide Gattungen deutlich seltener Auslöser für die Erkrankung sind. Beide Gattungen kommen häufig in Meeresfischen vor (Priebe 2007: 299).

Angehörige dieser Gattung stellen die häufigsten, bei marinen Knochenfischen vorkommenden Nematodenarten dar. Im Gegensatz zu *Anisakis simplex* und *Pseudoterranova decipiens* werden sie bereits in den Fischen als Magen-Darm-Parasiten geschlechtsreif und passen sich nicht an die Körpertemperaturen der Säuger und Vögel an. Aus diesem Grund weisen die Larven im dritten Stadium in den Säugern auch kein Migrationsverhalten bei 37 °C auf und sind infolgedessen durch den Fischverzehr für den Menschen nicht gefährlich. Die Gattung *Hysterothylacium aduncum* ist im Nordostatlantik die verbreitetste Art (Priebe 2007: 299). Knochenfische werden als Endwirte und parasitär befallene Wirte für die Angehörigen dieser Gattung genutzt (Priebe 2007: 299). Besonders häufig befällt die Larve III die Eingeweide und die Leber der als Transport- oder Stapelwirt dienenden Fische. Genauso wie die Gattungen *Anisakis simplex* und *Pseudoterranova decipiens* besitzt die Larve III am Hinterende ein spitz zulaufendes, deutlich abgesetztes Mucron. Lichtmikroskopisch kann unter der Kutikula der artcharakteristische, stachelige „Kaktusschwanz“ festgestellt werden (Priebe 2007: 300).

Die Gattung *Contracaecum* kommt weltweit in marinen Säugern und Vögeln als Darmparasit vor. „Das Risiko, dass beim Verzehr von befallenen Fischen lebende Drittlarven vom Menschen aufgenommen werden, wird als sehr gering eingeschätzt, weil die Larve nicht in den zum Verzehr verwendeten Fischteilen vorkommt“ (Priebe 2007: 300). Vorwiegend sind die Eingeweide und die Leber befallen. Untersuchungen des Hinterendes zeigen Unterschiede zu den bereits aufgezählten Gattungen der Familie der Anisakidae auf. Bei *Contracaecum* ist kein typisches Mucron auszumachen, da das Hinterende spitz zuläuft (ebd.).

### **2.3 Anisakiasis**

Als Anisakiasis wird die Krankheit bezeichnet, die in den meisten Fällen durch *Anisakis simplex* oder *Pseudoterranova decipiens* übertragen wird, wenn diese durch den Konsum von rohem oder unzureichend zubereitetem Seefisch lebendig verzehrt werden (Krauss et al. 2004: 473). Die NL parasitieren den Menschen als Fehlwirt in der dritten Larvenform, wo es jedoch zu keiner Weiterentwicklung kommt (Suh und Keystone 2008: 1341). Anisakiasis gehört damit zu den Zoonosen. Der Begriff Zoonose setzt sich aus den griechischen Wörtern *zoon* (Lebewesen) und *nosos* (Krankheit) zusammen und steht für Infektionskrankheiten, die wechsel-

seitig zwischen Mensch und Tier übertragen werden (Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) o.J.). Das Bundesinstitut für Risikobewertung bestätigt, dass Zoonosen durch ein schnelles Bevölkerungswachstum, eine zunehmende Mobilität, veränderte Tierzucht und -haltung sowie Klimaveränderungen immer mehr an Bedeutung gewinnen (ebd.).

*Anisakis simplex* oder *Pseudoterranova decipiens* dringen in die Magen- und Dünndarmwand ein (Krauss et al. 2004: 472) und verursachen lokale Entzündungen und Blutungen, welche nach ungefähr zehn Tagen wieder abklingen (Suh und Keystone 2008: 1341). Allgemeine Symptome sind Bauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Aufgrund der wenig präzisen Symptome werden häufig Fehldiagnosen, wie zum Beispiel einer Blinddarmentzündung, Unterleibsschmerzen oder einem Magengeschwür gestellt (Sakanari und McKerrow 1989: 278f). Eine Darmspiegelung wird angeraten, da dadurch die Larven identifiziert und direkt entfernt werden können (Krauss et al. 2004: 475).

Es besteht zudem die Gefahr eines anaphylaktischen Schocks. Eine allergische Reaktion kann auch durch die Aufnahme bereits abgetöteter Larven ausgelöst werden (Krauss et al. 2004: 472).

Vor allem in Spanien, Frankreich, Japan, den Niederlanden und Nordamerika werden Fälle dieser Krankheit verzeichnet (Krauss et al. 2004: 473). Jedes Jahr sind rund 20.000 Menschen davon befallen (Biodiversität und Klima Forschungszentrum (BiK-F) 2012: 1). Bedingt durch spezielle Ernährungsgewohnheiten sind die meisten Fälle in Japan aufgetreten, wobei eine hohe Dunkelziffer besteht. *Anisakis simplex* konnte in über 150 Fischarten und in Tintenfischen nachgewiesen werden. 1998 waren in norwegischen Gewässern 97 % der Pollacks, 92 % der Dorsche und 60 % der Rotbarsche befallen (Eckert et al. 2008: 323).

## **2.4 Gesetzliche Aspekte**

Aufgrund des vorbeugenden Verbraucherschutzes vor Zoonosen sind gesetzliche Regelungen zwingend erforderlich. Dabei beziehen sich die gesetzlichen Regelungen ausschließlich auf das Durchleuchtungsverfahren (engl. candling), welches im Methodenteil ausführlich beschrieben wird. Hinzu kommt, dass bei dem Verbraucher der ästhetische Aspekt eine große Rolle spielt. Wurden im Fisch NL aufgefunden, kann dies dazu führen, dass Fischmahlzeiten für längere Zeit oder gar für immer vom Verbraucher gemieden werden. Die Europäische Union hat infolgedessen Verordnungen festgelegt, die in allen Mitgliedsstaaten einzuhalten sind (Karl 2008: 113f). Zudem gibt es für Fischereiprodukte eine Reihe von Standards, die von der Codex Alimentarius Kommission erlassen wurden (Codex Alimentarius Commission o.J.a).

Die Codex Alimentarius Kommission ist eine im Jahr 1963 gegründete gemeinsame Kommission der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation (FAO) und der Weltgesundheitsorganisation der Vereinten Nationen (WHO) (Codex Alimentarius Commission o.J.b; Bundesverband der deutschen Fischindustrie und des Fischgroßhandels e.V. 2005: 74). Die Kommission entwickelt in Übereinstimmung gebrachte Lebensmittelstandards, Richtlinien und Verhaltensregeln, um die Gesundheit der Verbraucher zu schützen und einen fairen Lebensmittelhandel sicherzustellen (Bundesverband der deutschen Fischindustrie und des Fischgroßhandels e.V. 2005: 74). Außerdem ist es Aufgabe, „die Normungsarbeiten im Lebensmittelbereich auf internationaler Ebene zu koordinieren“ (ebd.).

Es gibt eine Vielzahl von Codex Standards, die sich auf konservierte, tiefgekühlte oder getrocknete Fischereiprodukte beziehen. Darunter sind auch einige Standards, die die Handhabung von parasitär befallenen Fischprodukten regulieren. Diese sind Codex Standards Nr. 165 und Nr. 190 aus dem Jahr 1995, sowie Nr. 244 aus dem Jahr 2004 (Codex Alimentarius Commission o.J.a).

Codex STAN 165, 1995 ist ein Standard für tiefgekühlte Fischfilet-Blöcke, zerkleinertes Fischfleisch, Mixturen von Filets und zerkleinertem Fischfleisch. Codex STAN 190, 1995 ist ein Standard für tiefgekühlte Fischfilets (ebd.).

Beide Standards legen Voraussetzungen für die Detektion von Parasiten mit der Durchleuchtungsmethode fest, definieren Parasiten und geben für Parasiten in Fischereiprodukte erlaubte Erscheinungsmerkmale wider (Karl 2008: 114). Es wird zum Beispiel dargelegt, dass die Ware als mangelhaft definiert wird, wenn zwei oder mehr Parasiten pro Kilogramm je Stichprobeneinheit mit einem kapselförmigen Durchmesser von mehr als 3 mm oder einem nicht kapselförmigen Durchmesser von größer als 10 mm entdeckt werden (Codex Alimentarius Commission 1995: 5).

Codex STAN 244, 2004 ist ein Standard für gesalzene Heringe aus dem Atlantik und gesalzene Sprossen. In Anhang I dieses Standards wird das Digestionsverfahren mithilfe eines Magnetrührers beschrieben (Codex Alimentarius Commission 2004: 5). Dieses Verfahren wird bei späteren Versuchen exakt nach diesen Richtlinien durchgeführt.

In der EU-Verordnung 853/2004 sind die spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs festgelegt, darunter auch Regelungen zum Schutz vor Parasiten. Es werden die Anforderungen für Handhabung von Fischereiprodukten bezüglich Parasiten (Kapitel III D.) und die Regelungen für den Lebensmittelhändler im Umgang mit parasitär kontaminierten Fischereiprodukten beschrieben (Kapitel V D.) (Europäische Union 2004a).



In Kapitel III D. dieser Verordnung ist vermerkt, dass Fischereiprodukte (Rohware und Endzeugnis) bei -20 °C oder kälteren Temperaturen für mindestens 24 Stunden gelagert werden müssen (Europäische Union 2004a: 113f). Diese Anforderungen gelten für Fischereiprodukte, die roh oder nicht ausreichend erhitzt verzehrt werden, wie zum Beispiel Sushi, Sashimi, Fischcarpaccio oder Ceviche (roh marinierter Fisch). Zudem gilt dies für Heringe, Makrelen, Sprotten, (wilde) Atlantische oder Pazifische Lachse, welche bei weniger als 60 °C kaltgeräuchert werden, und für marinierte und/ oder gesalzene Fischereiprodukte. Bei diesen Verarbeitungsbedingungen kann keine ausreichende Abtötung gewährleistet werden, sodass das Tiefgefrieren im ersten Schritt eine Notwendigkeit darstellt, um sicherzustellen, dass sich im Fisch befindliche Parasiten abgetötet werden (ebd.).

Kapitel V D. besagt, dass Lebensmittelunternehmer dazu verpflichtet sind, Fischereiprodukte vor dem Verkauf einer Sichtkontrolle auf Parasiten zu unterziehen. Offensichtlich mit Parasiten kontaminierte Fische dürfen nicht zum menschlichen Verzehr verkauft werden (ebd.: 116).

Die EU-Verordnung 2074/2005 bezieht sich im Anhang II ausschließlich auf Fischereierzeugnisse. In Anhang II Kapitel I werden spezialisierte Definitionen von sichtbaren Parasiten, der Sichtkontrolle und Durchleuchtung festgelegt. In Kapitel II werden genaue Regeln bei der Sichtkontrolle beschrieben, um Parasiten in Fischereiprodukten zu entdecken. Im Allgemeinen sind die Lebensmittelhersteller dafür verantwortlich alle Stufen der Produktion von Fischereiprodukten zu überprüfen (Europäische Union 2005: 9).

Als sichtbarer Parasit wird in Anhang II Kapitel I „ein Parasit oder eine Gruppe von Parasiten in einer Größe, von einer Farbe oder mit einer Textur“ (ebd.) definiert, „die sich vom Fischgewebe deutlich unterscheidet“ (ebd.). Die Sichtkontrolle wird als eine „nicht destruktive Untersuchung von Fischen oder Fischereierzeugnissen mit oder ohne optische Vergrößerung bei für die Sehkraft des Menschen guten Lichtverhältnissen, erforderlichenfalls auch mittels Durchleuchtung“ (ebd.) beschrieben. Eine Durchleuchtung wird als eine Untersuchung „von Plattfischen oder Fischfilets auf Parasiten durch Betrachtung vor einer Lichtquelle in einem abgedunkelten Raum“ (ebd.) geschildert. Hierbei fehlen jedoch genauere Angaben bezüglich der Lichtstärke.

In Anhang II Kapitel II wird die Sichtkontrolle nochmals genauer dargestellt. Dabei wird verdeutlicht, dass eine Sichtkontrolle an einer repräsentativen Anzahl an Proben vorgenommen wird. „Die für Landbetriebe verantwortlichen Personen sowie qualifizierte Personen an Bord von Fabrikschiffen entscheiden je nach Art der Fischereierzeugnisse, ihrem geografischen

Ursprung und ihrer Verwendung über Umfang und Häufigkeit der Kontrollen. Während der Produktion werden ausgenommene Fische (d. h. Bauchhöhle, Leber und zum Verzehr bestimmte Rogen) von qualifizierten Personen der Sichtkontrolle unterzogen“ (ebd.). Die Sichtkontrolle erfolgt entweder zum Zeitpunkt des Ausnehmens und beim Waschen (beim manuellen Ausnehmen) oder anhand einer repräsentativen Anzahl von mindestens zehn Fischen pro Charge (beim maschinellen Ausnehmen). „Bei Fischfilets oder Fisch in Scheiben wird die Sichtkontrolle von qualifizierten Personen während des Zurichtens und nach dem Filetieren oder Zerlegen in Scheiben vorgenommen. Kann eine einzelne Sichtkontrolle aufgrund der Größe der Filets oder des Filetierungsvorgangs nicht durchgeführt werden, so ist ein Stichprobenplan aufzustellen und der zuständigen Behörde [...] zur Verfügung zu stellen. Ist die Durchleuchtung von Filets technisch gesehen unumgänglich, so ist dies im Stichprobenplan anzugeben“ (ebd.).

Obwohl sich die gesamten Gesetze nur auf das Durchleuchtungsverfahren beziehen, legt das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) dar, dass die im späteren Methodenteil ausführlich beschriebene Digestionsmethode von hoher Aussagekraft sei und eigentlich die Methode der Wahl sein solle. Es wird zudem eindeutig darauf hingewiesen, dass die vorgeschriebene Durchleuchtungsmethode für Wildlachse aufgrund der intensiven Eigenfärbung der Fischmuskulatur nicht geeignet sei „um zu verhindern, dass entsprechend Verordnung ( EG ) Nr. 853/2004 vom 29.4.2004, Kap. V D eindeutig von Parasiten befallene Fischereierzeugnisse für den menschlichen Verzehr in Verkehr gebracht werden“ (Etzel und Ramdohr 2006: 192).

Die EU-Verordnung 854/2004 besagt in Anhang II, Kapitel II F., dass im Zuge der amtlichen Überwachung und im Besonderen „zur Überprüfung der Einhaltung der Gemeinschaftsvorschriften in Bezug auf Parasiten Stichproben tests durchgeführt“ (Europäische Union 2004b: 108) werden müssen. Im Anschluss an die Kontrollen müssen Fischereierzeugnisse für genussuntauglich erklärt werden, wenn „die organoleptische, chemische, physikalische oder mikrobiologische Prüfung oder Prüfung auf Parasiten ergibt, dass sie nicht den einschlägigen Vorschriften des Gemeinschaftsrechts entsprechen“ (ebd.: 109) (Kapitel III, Nr. 1).

Die einzelnen Bundesländer sind gemäß Grundgesetz für die amtliche Lebensmittelüberwachung zuständig. Damit die Rechtsvorschriften von den Bundesländern nicht unterschiedlich ausgelegt werden, wurden zwei Arbeitskreise als Gremien der Sachverständigen gebildet (Verbraucherzentrale o.J.). Zum einen den Arbeitskreis Lebensmittelchemischer Sachverständiger (kurz: ALS) und zum anderen den Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhy-

giene und der vom Tier stammenden Lebensmittel tätigen Sachverständigen (kurz: ALTS). Die Beschlüsse dieser Gremien sollen einheitliche Bewertungen der Lebensmittelüberwachung sicherstellen und werden in den einzelnen Untersuchungsämtern durchgesetzt.

Der ALS besteht aus einem Vertreter jedes Bundeslandes und einigen ständigen Gästen, zum Beispiel das BMEL (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft). Der ALTS sieht sich überwiegend als Gremium der Tierärzte an (ebd.).

Beide Gremien entscheiden über die Vorschläge aus den Arbeitsgruppen. Die Beschlüsse werden nach entsprechenden Diskussionen getroffen, wenn mehr als drei Viertel der anwesenden Mitglieder dem Beschluss zustimmen. Die Beschlüsse sind im Internet abrufbar und nicht rechtsverbindlich. „Sie haben Charakter von Sachverständigen-Gutachten. Themen, die sowohl ALS als auch ALTS betreffen werden zwischen beiden Arbeitskreisen abgestimmt“ (Verbraucherzentrale o.J.).

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Fisch**

Auf dem Hamburger Fischmarkt in Altona wurden 50 ganze Nordsee-Heringe (*Clupea harengus*), 24 ebenfalls ganze, jedoch bereits eviszierte, sprich ausgeweidete, Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und drei Lachsseiten (*Salmo salar*) mit einem Gewicht von insgesamt 4,5 kg gekauft. Die Heringe wurden benötigt, um daraus NL zu isolieren und mit dem Heringsfilet Vorversuche (VV) durchzuführen. Mit den Forellen- und Lachsfilets sollten die Hauptversuche (HV) durchgeführt werden. Für einige VV wurden zudem Kabeljaufilets (*Gadus morhua*) verwendet, welche bis zur Verwendung tiefgekühlt wurden. Die Kabeljaue wurden im November 2013 bei einer Seereise des Max Rubner Instituts vor Grönland gefangen.

##### **3.1.2 Chemikalien**

###### **3.1.2.1 Pepsin**

Das verwendete Pepsin mit der Artikelnummer 107190 stammt von der Firma Merck KGaA Darmstadt, Deutschland. Das Enzym, aus der Magenschleimhaut vom Schwein, weist eine Aktivität von 2000 FIP-U/g EC 3.4.23.1 auf. „1 FIP-Unit ( $\approx$ Ph. Eur.-Unit) Pepsinaktivität

bewirkt den Abbau von Hämoglobin während 1 Minute Inkubation bei  $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ “ (Carl Roth GmbH + Co. KG o.J.).

### **3.1.2.2 Salzsäure**

Die eingesetzte rauchende Salzsäure mit einer Konzentration von 37 % kommt von der Firma Merck KGaA Darmstadt, Deutschland und hat die Artikelnummer 113386.

### **3.1.3 Schüttelwasserbad**

Abbildung 4 zeigt das SWB Typ 1083 der Firma GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH Burgwedel, Deutschland, welches für die Versuchsreihen am SWB verwendet wurde. Es lässt sich eine Schüttelfrequenz zwischen  $10\text{-}250 \text{ min}^{-1}$  einstellen. Die für alle Versuche verwendete Schüttelfrequenz lag bei  $138 \text{ min}^{-1}$ . Es verfügt über einen Temperaturbereich mit digitaler Anzeige von ca.  $3 \text{ }^\circ\text{C}$  über Leitungswassertemperatur bis  $99,9 \text{ }^\circ\text{C}$ . Für die ersten Versuche wurde eine Temperatur von  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , bei späteren Versuchen Temperaturen von  $34,5 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  eingestellt. Bis sich das SWB auf eingestellte  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt hatte, dauerte es ca. 20 Minuten. Im SWB hatten fünfzehn 1 L-Plastik-Prüfgefäße Platz. Dabei wurden zehn Prüfgefäße mit einem bestimmten Verhältnis von Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung und die restlichen fünf Prüfgefäße mit 500 mL Leitungswasser befüllt. Insgesamt 9 L Leitungswasser wurden verwendet, um das SWB zu füllen. Es war wichtig zu beachten, dass das SWB nicht mit zu viel Wasser befüllt wurde, um ein mögliches Überschwappen während des Schüttelvorgangs zu verhindern. Es musste jedoch genügend Wasser im SWB vorhanden sein, um zu gewährleisten, dass der Digestionsvorgang optimal ablaufen konnte.



Abbildung 4: verwendetes SWB (Quelle: eigenes Bild)

## 3.2 Methoden zum Nachweis von Nematodenlarven

### 3.2.1 Durchleuchtung

Die einzig in Gesetzen berücksichtigte Methode zum Nachweis von Nematodenlarven im Fischmuskel ist die Durchleuchtung. Im Max Rubner-Institut werden die zu untersuchenden Fische filetiert, enthäutet, gewogen und auf den eingeschalteten Leuchttisch gelegt (Leuchtstärke der Tische in Codex STAN 190-1995), wo sie visuell untersucht werden (Max Rubner-Institut o.J.a: 2).

Fünf Minuten vor dem Untersuchungsbeginn wird der Leuchttisch eingeschaltet, um visuell zu überprüfen, ob die Leuchtmittel funktionsfähig sind. Um sichtbare NL zu finden, wird jedes Filet von beiden Seiten durchleuchtet. Auf einem Formblatt wird die Anzahl sichtbarer NL festgehalten, wobei halbe NL extra zu notieren sind. Es kann zudem zwischen NL aus dem Bauchlappen oder dem Filet unterschieden werden (ebd.: 2f).

### 3.2.2 Digestion

Bei der Digestion handelt es sich um „ein Routineverfahren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von NL in Fischen“ (Max Rubner-Institut o.J.b: 2). Das Fischfilet wird mit der Hand zerkleinert und mit einer Pepsin-Verdauungslösung versetzt. Bei 35 °C wird das zerkleinerte Filet unter Rühren vollständig aufgelöst. Die im Rückstand verbleibenden NL werden über ein Sieb dekantiert und ausgezählt. Der Nachweis erfolgt gemäß Codex Standard 244-2004 Annex I (ebd.).

Zunächst muss die Pepsin-HCl-Lösung angesetzt werden. Dazu wird ein 10 L PE-Kanister mit ca. 4 L warmem Leitungswasser (ca. 30 °C) befüllt. 54 mL 37 %ige HCl-Lösung werden abgewogen und hinzugefügt. Der Ansatz wird geschüttelt und mit weiteren 2 L kaltem Wasser versetzt. In einem 100 mL Becherglas werden 50 g Pepsin auf +/- 0,1 g genau abgewogen. Über einen Pulvertrichter wird das Pepsin vorsichtig in den Kanister geschüttelt. Das verwendete Becherglas wird mit 80 mL Wasser ausgespült und der Ansatz in den Kanister gegeben. Der Kanister wird erneut kräftig durchgeschüttelt. Mit warmem Leitungswasser wird der Kanister bis zur 10 L Marke gefüllt und nochmals geschüttelt (ebd.).

200 g des mit der Hand zerkleinerten Fischfilets werden in ein 2 L Becherglas überführt und mit 1,8 L Pepsin-HCl-Lösung aufgefüllt (ebd.: 3). Auf einem Magnetrührer mit Heizplatte und einem Kontaktthermometer wird der Ansatz nach Zugabe eines länglich, eckigen Magnetrührstäbchens (sog. Rührfisch) unter langsamem Rühren auf eine Temperatur von 35 °C erhitzt. Der Rührvorgang dauert zwischen einer und zwei Stunden. Falls das Fischfilet nicht vollständig verdaut wurde, wird die Lösung über ein feines Sieb mit einer Maschengröße von 1000 µm (= 1 mm) dekantiert. Der Rückstand wird mit Leitungswasser gespült und wieder in das Becherglas überführt. Weitere 700 mL der Pepsin-HCl-Lösung werden hinzugegeben und so lange bei 35 °C gerührt, bis sämtliches Fischfilet verdaut ist. Die verdaute Lösung wird durch ein Sieb gegossen, das Becherglas mit Leitungswasser gespült und der Inhalt ebenfalls über das Sieb dekantiert. Der sich im Sieb befindliche Rückstand wird mit Leitungswasser gespült. Danach noch verbleibende Rückstände werden in schwarze Kunststoffschalen überführt, die mit etwas Pepsin-HCl-Lösung gefüllt sind. Dort werden die NL ausgezählt, die Anzahl gefundener NL in einem Formblatt festgehalten, wobei halbe NL extra zu notieren sind (ebd.).

Diese Digestionsmethode bringt den großen Nachteil mit sich, dass oft nur noch Stücke von NL im Rückstand zu finden sind und es deswegen erschwert ist, quantitativ genau sagen zu können, wie viele NL tatsächlich im rohen Fischfleisch enthalten waren. Es kann sogar passieren, dass NL komplett verdaut werden.

### **3.2.3 Schüttelwasserbadverfahren**

Bei der SWB-Methode wird zerkleinertes Fischfilet in Plastik-Prüfgefäße gefüllt und mit einer Pepsin-Verdauungslösung versetzt. Bis zu 15 Plastik-Prüfgefäße, die ein Fassungsvermögen von einem Liter aufweisen, können in das SWB eingesetzt werden. Wird nur eine gewisse Anzahl an Probengefäßen für den Verdauungsvorgang angesetzt, werden die restlichen Prüfgefäße bis zur 500 mL Marke mit Leitungswasser gefüllt. Möglicher Vorteil der SWB-

Methode ist, dass durch die Nachahmung der natürlichen Magenvorgänge durch sanftes Schütteln die NL nach dem Verdauungsvorgang ganz bleiben.

Dadurch, dass es sich bei dem Schütteln statt des Rührens um eine sanftere Bewegung handelt, muss diese Methode dementsprechend auch für einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, damit das gesamte Fischfilet verdaut wird. Wichtig ist die quantitative Auswertung der NL im Fischmuskel durch das Auszählen von ganzen NL. Bei vorherigen nationalen Ringversuchen ist häufig das Problem aufgetreten, dass die zu untersuchenden Proben nicht ganz verdaut wurden und die NL dadurch oft nicht detektiert wurden. Hinzu kam, dass häufig nur Bruchstücke gefunden wurden (Karl und Ostermeyer 2012: 7).

## **4. Durchführung**

### **4.1 Vorbereitung der Hauptversuche**

Auf dem Fischmarkt Hamburg Altona wurden 50 fangfrische Nordsee-Heringe gekauft, aus denen NL isoliert werden sollten. Dafür wurden diese an der Bauchseite aufgeschnitten und aufgeklappt. Nach dem Aufklappen waren in der Bauchhöhle einiger Heringe auf den ersten Blick NL zu sehen, welche mithilfe einer Pinzette direkt isoliert werden konnten. Um möglichst viele NL zu finden, wurde der Fisch evisziert. Als ergiebige NL-Quelle wurde der Hering ausgewählt, da dieser besonders oft von der Fadenwurmart *Anisakis simplex* befallen ist. Dies wird umgangssprachlich dadurch bestätigt, dass *Anisakis simplex* auch als „Heringswurm“ bezeichnet wird. Das ungenutzte Heringsfilet diente als Fischmasse für spätere VV. Dafür wurden die Heringe nach der Isolierung der NL filetiert, gehäutet und weitestgehend entgrätet. Anschließend wurden die Filetstücke in beschriftete Tüten abgefüllt und bis zur Verwendung tiefgekühlt. Die isolierten und lebenden NL wurden in einer Petrischale aufbewahrt, welche mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung befüllt war.

Ziel war es, ungefähr 500 NL aus den Heringen zu gewinnen, um später genügend NL für die VV und die HV an Forellen- und Lachsfilets zu haben. Da in den 50 Heringen jedoch nur 450 NL gefunden wurden, musste auf bereits eingefrorene Heringe, welche schon länger im Kühlraum gelagert wurden, zurückgegriffen werden.

Für die Herstellung der Proben für die HV wurden ebenfalls auf dem Hamburger Fischmarkt 24 ganze Forellen und drei Lachsseiten mit einem Mindestgewicht von 1,5 kg pro Seite gekauft. Für jede der beiden Digestionsarten (bekannte Digestion am Magnetrührer und neu entwickelte Digestion mithilfe des Schüttelwasserbads) wurde unter identischen Bedingungen die gleiche Anzahl an Forellen- und Lachsproben mit der gleichen Anzahl an NL vorbereitet.

So war es möglich, die beiden Methoden nach der Ergebnisauswertung miteinander zu vergleichen. Die genaue Anzahl zugesetzter NL für die jeweiligen Filetstücke ist den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen. Die mit einem Sternchen (\*) gekennzeichneten Zahlen bedeuten, dass NL verwendet wurden, die bereits gefroren waren.

Für die Herstellung der Forellenproben wurden die Forellen filetiert, der Bauchlappen weggeschnitten, sowie die Haut, welche im Digestionsvorgang nicht mit verdaut wird, entfernt. Anschließend wurden die Forellenfilets mit lebenden NL versetzt und in einzeln beschriftete Plastikbeutel gelegt. Dafür wurden mithilfe eines Skalpell kleine Taschen in das Filet geschnitten und mit einer Pinzette eine NL in jede Tasche eingesetzt. Die Plastikbeutel wurden mit folgenden Informationen beschriftet: Name der Praktikantin, Datum, Nr. des Filets, Anzahl der eingesetzten NL und Digestionsart.

Bei den bereits entgräteten und verzehrfertigen drei Lachsseiten wurde die Haut weggeschnitten und jeweils 180 g Filetstücke zugeschnitten. Die einzelnen Filets wurden ebenfalls anschließend mit lebenden NL versetzt und in einzeln beschriftete Plastikbeutel verpackt.

Alle Proben wurden bei -25 °C im Tiefkühlraum des Institutes gelagert. Bis zur Verwendung dieser Proben sind ca. 9 Wochen vergangen.

Tabelle 1: Forellenfiletproben für die Hauptversuche – Anzahl der zugefügten NL

Forellenfiletproben		
Fisch-Nr.	Anzahl der hinzugefügten NL	
	Digestion Magnetrührer	Digestion SWB
1	1	1
2	1	1
3	3	3
4	3	3
5	3	3
6	5	5
7	5	5
8	5	5
9	5	5
10	5	5
11	7	7
12	7	7
13	7	7
14	10	10
15	10	10
16	10	10
17	10	10
18	10	10
19	10*	10*



20	10*	10*
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	-	-

\*) tiefgefroren

Tabelle 2: Lachsfiletproben für die Hauptversuche – Anzahl der zugefügten NL

Lachsfiletproben		
Fisch-Nr.	Anzahl der hinzugefügten NL	
	Digestion Magnetrührer	Digestion SWB
1	5	5
2	5	5
3	5	5
4	5	5
5	5	5
6	10	10
7	10	10
8	10	10
9	10	10
10	10	10

## 4.2 Vorversuche

Die Durchführung von VV am SWB war notwendig, um die optimalen Einstellungen am SWB für die Digestion der HV-Proben herauszufinden. Es sollte erreicht werden, dass nach dem Digestionsvorgang nur noch wenig Fischfilet-Rückstandsmenge übrig bleibt. Zudem sollte überprüft werden, ob die Methode auch mit bereits eingefrorenen NL durchgeführt werden kann und diese nach der Digestion ganz bleiben und somit quantitativ ausgezählt werden können. Bei einigen Versuchen wurde mithilfe eines ovalen Rührfisch-Zusatzes überprüft, ob damit eine verbesserte Digestion zu erreichen ist. Hinzu kommt, dass mit Fischarten unterschiedlichen Fettgehaltes gearbeitet wurde (als Magerfisch der Kabeljau und als Fettfisch der Hering), um die Ergebnisse der Digestion vergleichen zu können.

Es stellten sich unter anderem folgende Fragen, um die optimale Einstellung zur Verdauung im SWB zu finden: Welche Schüttelgeschwindigkeit muss gewählt werden? Bei welchem Verhältnis von Fischfilet zu Pepsin-HCl-Lösung läuft die Digestion unter optimalen Voraussetzungen ab?

Für die VV wurden zunächst zwei unterschiedliche Methoden der Durchführung getestet. Dafür wurde bei den VV I und III zunächst eine Digestionsmethode durchgeführt bei der vier

Mal alle zwei Stunden der Rückstand der Fischmasse ausgewogen und dokumentiert wurde, um die fortschreitende Digestion festzustellen. Im Vergleich dazu wurde bei dem VV II und den VV IV-VIII, sowie bei den Tests I-III am SWB die Digestion über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Auch nach diesen Messungen wurde geprüft, wie viel Fischfilet-Rückstand nach dem Digestionsvorgang zu verzeichnen ist. Bei den VV IV und VI wurde das SWB über 14 Stunden angeschaltet. Bei allen anderen VV und Tests wurde einer 14-stündigen Digestion über Nacht eine dreißigminütige Nachverdauung am nächsten Morgen angehängt. Dafür wurde nach den 14 Stunden ein großer Anteil der alten Pepsin-HCl-Lösung abgeschüttet und das Prüfgefäß mit dem darin enthaltenen Rückstand mit einem gewissen Anteil an neuer Pepsin-HCl-Lösung wieder aufgefüllt. Vor der Durchführung musste stets eine gewisse Menge der Pepsin-HCl-Lösung angesetzt werden. Für jedes der zehn Prüfgefäße wurden zunächst 900 mL für den ersten Digestionsvorgang eingesetzt. Das bedeutet, dass 9 Liter Pepsin-HCl-Lösung benötigt wurden. Für den zweiten Digestionsvorgang wurden zudem pro Prüfgefäß noch einmal 400 mL der Pepsin-HCl-Lösung verbraucht. Insgesamt war für einen VV folglich eine Pepsin-HCl-Menge von 13 Litern erforderlich.

VV II war der einzige Versuch, bei dem keine NL zugesetzt wurden. Bei diesem Versuch ging es darum zu erfahren, welches das optimale Verhältnis von Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung ist, um eine möglichst niedrige Rückstandsmenge zu erhalten.

Bei dem VV I, sowie bei den VV III-VI wurden der zerkleinerten Fischmasse nachträglich die aus den Heringen isolierten, lebenden NL hinzugefügt. Die Anzahl der hinzugefügten NL belief sich bei allen Versuchen auf zwei Stück. Da zum Schluss nicht mehr genügend NL zur Verfügung standen, musste bei dem letzten VV mit lebenden NL bei drei von zehn Probengefäßen auf jeweils eine NL verzichtet werden. Die Gesamtzahl der zugefügten NL belief sich bei VV VI dementsprechend auf 17 NL.

Bei den VV VII und VIII wurden bereits eingefrorene NL benutzt. Bei VV VII wurden jeweils drei und bei VV VIII jeweils zwei NL dem Prüfgefäß hinzugefügt. Diese stammten aus vergangenen Seereisen und wurden damals aus verschiedenen Fischarten isoliert. Bis zur Verwendung wurden diese ohne Unterbrechung tiefgekühlt gelagert. Erst ab diesen Versuchen war es möglich, treffende Aussagen bezüglich der Ganzheit der NL nach den Digestionsvorgängen zu treffen.

#### **4.2.1 Messung vier Mal alle zwei Stunden**

Das aufgetaute Fischfilet wurde in kleine Stücke zerrupft und eine bestimmte Menge davon in ein nummeriertes 1 L Plastik-Prüfgefäß eingewogen. Eine gewisse Anzahl von NL wurde

zugesetzt. Anschließend wurde in das Prüfgefäß eine gewisse Menge der Pepsin-HCl-Lösung eingefüllt und das Gefäß mit einem Schraubdeckel verschlossen. Die mit Fischmasse und Pepsin-HCl-Lösung gefüllten Prüfgefäße wurden in das SWB eingesetzt, welches vorab mit 9 L Leitungswasser befüllt wurde. Die restlichen Prüfgefäße wurden mit 500 mL Leitungswasser aufgefüllt und ebenfalls in das SWB gestellt. Das SWB wurde bei einer Temperatur von 37 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 138 min<sup>-1</sup> über zwei Stunden angestellt. Der Messvorgang wurde vier Mal alle zwei Stunden wie folgt durchgeführt: Das Gewicht des Edelstahlsiebes wurde notiert. Ein 2 L Becherglas wurde auf die Waage gestellt und das Edelstahlsieb auf diesem platziert. Der Inhalt des Prüfgefäßes wurde über das Sieb dekantiert, sodass der Rückstand sich darin sammeln konnte. Für 90 Sekunden sollte der darin befindliche Rückstand abtropfen. Das Edelstahlsieb wurde erneut gewogen und das Gewicht des Rückstandes errechnet. Für den nachfolgenden Digestionsvorgang wurden der Rückstand und die aufgefangene Flüssigkeit erneut ins Prüfgefäß umgefüllt. Es musste darauf geachtet werden, dass jeglicher Rückstand aus dem Sieb zurück ins Prüfgefäß gefüllt wurde, um möglichst genaue Werte herauszubekommen und sich zudem keine NL in dem Sieb befinden. Dieser Vorgang wurde für alle angesetzten Prüfgefäße durchgeführt. Anschließend wurde das SWB erneut angestellt und nach weiteren zwei Stunden der zweite Messvorgang durchgeführt. Nach acht Stunden und vier Messvorgängen wurde die Pepsin-HCl-Lösung weggeschüttet und eventuelle Fischmuskelreste entsorgt.

#### **4.2.2 Messung nach 14 Stunden/ Messung nach 14 Stunden mit dreißigminütiger Nachverdauung**

Das aufgetaute Fischfilet wurde in kleine Stücke zerrupft und eine bestimmte Menge davon in ein nummeriertes 1 L Plastik-Prüfgefäß eingewogen. Eine gewisse Anzahl von NL wurde zugesetzt. Anschließend wurde in das Prüfgefäß eine gewisse Menge der Pepsin-HCl-Lösung eingefüllt und das Gefäß mit einem Schraubdeckel verschlossen. Die mit Fischmasse und Pepsin-HCl-Lösung gefüllten Prüfgefäße wurden in das SWB eingesetzt, welches vorab mit 9 L Leitungswasser befüllt wurde. Die restlichen Prüfgefäße wurden mit 500 mL Leitungswasser aufgefüllt und ebenfalls in das SWB gestellt. Das SWB wurde bei einer Temperatur von 37 °C, bei späteren Versuchen dann bei einer Temperatur von 30 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 138 min<sup>-1</sup> über 14 Stunden angestellt.

Für die Messung nach 14 Stunden wurde das Gewicht des Edelstahlsiebes notiert. Ein 2 L Becherglas wurde auf die Waage gestellt und das Edelstahlsieb auf diesem platziert. Der Inhalt des Prüfgefäßes wurde über das Sieb dekantiert, sodass der Rückstand sich darin sam-

meln konnte. Für 90 Sekunden sollte der darin befindliche Rückstand abtropfen. Das Edelstahlsieb wurde erneut gewogen und das Gewicht des Rückstandes errechnet. Gefundene NL aus dem Sieb wurden in ein nummeriertes Mikroreaktionsgefäß überführt und anschließend unter dem Mikroskop auf Ganzheit untersucht. Die Pepsin-HCl-Lösung wurde weggeschüttet und der restliche Rückstand aus dem Sieb ausgespült.

Für die Messung nach 14 Stunden mit einer dreißigminütigen Nachverdauung wurden die Prüfgefäße nach dem Digestionsvorgang dem SWB entnommen, einmal über Kopf gedreht, sodass eventuell festklebender Rückstand sich vom Gefäßboden lösen konnte, und für eine halbe Stunde beiseite gestellt, damit der Rückstand zu Boden sinken konnte. Das Edelstahlsieb wurde über ein 2 Liter Becherglas positioniert und alte Pepsin-HCl-Lösung vorsichtig bis zur 200 mL Marke des Plastik-Prüfgefäßes abgeschüttet. Noch unverdaute Filetstücke oder ins Sieb gefallene NL wurden zurück in das Prüfgefäß gefüllt. 400 mL neue Pepsin-HCl-Lösung wurden in das Prüfgefäß gefüllt und dieser Vorgang mit allen Prüfgefäßen wiederholt. Anschließend wurden alle Prüfgefäße erneut in das SWB eingesetzt und nochmals für eine halbe Stunde mit den festgelegten Einstellungen angestellt. Nach dem zweiten Digestionsvorgang wurde das Gewicht des Edelstahlsiebes notiert. Ein 2 L Becherglas wurde auf die Waage gestellt und das Edelstahlsieb auf diesem platziert. Der Inhalt des Prüfgefäßes wurde über das Sieb dekantiert, sodass der Rückstand sich darin sammeln konnte. Für 90 Sekunden sollte der darin befindliche Rückstand abtropfen. Das Edelstahlsieb wurde erneut gewogen und das Gewicht des Rückstandes errechnet. Gefundene NL wurden aus dem Sieb in ein nummeriertes Mikroreaktionsgefäß überführt und anschließend unter dem Mikroskop auf Ganzheit untersucht. Die Pepsin-HCl-Lösung wurde weggeschüttet und der restliche Rückstand aus dem Sieb ausgespült.

## **4.3 Tests**

### **4.3.1 Tests am Magnetprüfer**

Für die Durchführung der Digestion mithilfe von Magnetprüfern wurden zwei Geräte genutzt, welche in Abbildung 5 abgebildet sind. Diese wurden zunächst in ihrer Funktionsfähigkeit überprüft. Es sollte an erster Stelle getestet werden, ob die Temperatureinstellungen der beiden Magnetprüfer mit den Thermometeranzeigen übereinstimmten. Zudem sollte eine optimale Rührfrequenz für die Digestionsvorgänge ermittelt werden. An zweiter Stelle konnte mit diesen Tests kontrolliert werden, ob die NL auch nach dem Verdauungsprozess ganz bleiben. Nur so konnte gewährleistet werden, dass die verwendeten Magnetprüfer für die HV an Forel-

len- und Lachsfilets geeignet sind. Um die Temperatur im Medium bestimmen zu können und die digitale Anzeige zu überprüfen, wurden zwei Thermometer so befestigt, dass ein Teil dessen in das Medium ragte.

Bei den Tests wurde ein Sieb mit einer Maschenweite von 1000  $\mu\text{m}$  (= 1 mm) benutzt, um wie im HV I verhindern zu können, dass NL beim Dekantieren durch ein zu grobmaschiges Sieb hindurch fallen und somit nicht mehr ausgezählt werden können.

Für die beiden Tests wurde homogenisierter Kabeljau als Fischmasse benutzt. In ein 2 L Becherglas wurden 200 g der Fischmasse eingewogen und zwei eingefrorene NL, sowie ein länglich, eckiger Rührfisch eingesetzt, welcher in Abbildung 8 im rechten Bild zu sehen ist. Das Becherglas wurde anschließend bis zur 1800 mL Marke mit Pepsin-HCl-Lösung befüllt. Während des gesamten Verdauungsvorgangs sollten 35 °C nicht überschritten werden. Der Ansatz wurde mit einer eingestellten Rührgeschwindigkeit von 420 rpm (engl. für: revolutions per minute) über 2 Stunden verdaut.



Abbildung 5: verwendete Magnetrührer (Quelle: eigenes Bild)

#### 4.3.2 Tests am SWB

Bei den Tests am SWB wurde überprüft, ob die Temperatur Einfluss auf die Ganzheit der NL hat. Aufgrund der wenig zufriedenstellenden Ergebnisse des HV I, welcher in der Reihenfolge vor den Tests durchgeführt worden ist und dessen Ergebnisse später präsentiert werden, wurde vermutet, dass die Digestionstemperatur zu hoch war und die NL deswegen zerstört wurden. Hinzu kam, dass die Tests am Magnetrührer bei einer geringeren Digestionstemperatur abliefen und optimale Ergebnisse bezogen auf die Rückstandsmenge und die Ganzheit der NL

erzielten. Aus diesen Gründen wurde Test I bei einer Temperatur von 34,5 °C durchgeführt. Als Fischmedium wurde homogenisierter Kabeljau herangezogen. Den zehn Proben wurden jeweils zwei gefrorene NL zugesetzt. Um die Durchführungen noch weiter zu optimieren wurden die Tests II und III bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Test II enthielt ebenfalls homogenisierten Kabeljau als Fischmasse und sollte allein Aufschluss darüber geben, ob eine weitere Temperatursenkung sich weiter positiv auf die Ganzheit der NL auswirkte. Test III wurde durchgeführt, um zu testen, ob auch ein per Hand zerrupfter Kabeljau sich nach diesen optimierten Einstellungen verdauen ließ. Den zehn Proben wurde jeweils eine NL zugesetzt. Bei allen drei Tests lief die Digestion über 14 Stunden mit einer anschließenden dreißigminütigen Nachverdauung.

#### **4.4 Hauptversuche**

##### **4.4.1 Hauptversuch I am SWB**

Für den HV I wurden die zehn für den Versuch herangezogenen Forellenfilets nach zweimonatiger Tiefkühl-Lagerung über zwei Nächte im 0 °C-Raum des Instituts aufgetaut und anschließend gewogen. Die Filets wiesen alle ein unterschiedliches Gewicht auf. So reichte die Spanne von 72,5 g bis 113,5 g pro Filet. Im Mittelwert ergab dies ein Gewicht von 101,05 g. Die Forellenfilets wurden mit der Hand zerrupft. Die Digestion lief über 14 Stunden mit anschließender dreißigminütiger Nachverdauung, welche in Kapitel 4.2.2 bereits ausführlich beschrieben wurde.

Es wurden die in den VV und Tests verwendeten Einstellungen am SWB verwendet.

##### **4.4.2 Hauptversuche I am Magnetprüfer**

Die für die HV am Magnetprüfer vorbereiteten Forellenfilets wurden im November einzeln in beschriftete Plastiktüten befüllt und nach ca. 8 Wochen für zwei Tage zum Auftauen in den 0 °C-Raum des Instituts gelegt. Anschließend wurden diese nacheinander gepresst und bis zur Verwendung im 0 °C-Raum gelagert. Die verwendeten 24 Forellenfilets hatten im Durchschnitt ein Gewicht von 104,42 g. Jedes Filet musste in dem 2 Liter Becherglas einzeln über zwei Stunden verdaut werden, um später genau sagen zu können wie viele der NL pro Filet tatsächlich wiedergefunden werden konnten. Das aus den Plastiktüten geschabte und geplättete Filet wurde mit einem länglich, eckigen Rührfisch versetzt und das Prüfgefäß bis zur 900 mL Marke mit Pepsin-HCl-Lösung aufgefüllt. Es wurde die Rührgeschwindigkeit gewählt, die auch in den Tests verwendet wurde.

Die eine Hälfte der zehn 180 g schweren Lachsfilets wurde in Plastikbeuteln per Hand zerdrückt und die andere mithilfe einer Maschine gepresst. Die Filets wurden in ein 2 L Becherglas gefüllt, mit einem länglich, eckigen Rührfisch versetzt und anschließend bis zur 1800 mL Marke mit der Pepsin-HCl-Lösung aufgefüllt. Auch diese Proben wurden über zwei Stunden bei der in den Tests verwendeten Rührgeschwindigkeit verdaut.

#### **4.4.3 Hauptversuche II am SWB**

Die für die HV am SWB vorbereiteten Forellen- und Lachsfilets wurden im November einzeln in beschriftete Plastiktüten befüllt und nach ca. 8 Wochen für zwei Tage zum Auftauen in den 0 °C-Raum des Instituts gelegt. Anschließend wurden diese nacheinander gepresst oder per Hand zerdrückt.

Das Gewicht der vierzehn verwendeten Forellenfilets betrug im Mittelwert 100,3 g und variierte zwischen 59 g und 128 g. Der Versuch wurde, wie auch die Mehrzahl der VV über 14 Stunden mit einer anschließenden dreißigminütigen Nachverdauung durchgeführt. Das fünfzehnte Prüfgefäß, das in das SWB gesetzt wurde, wurde bis zur 500 mL Marke mit Leitungswasser aufgefüllt.

Zu dem HV II gehörte zudem die Digestion von Lachsfilets, welche in zwei Durchgängen durchgeführt wurden. Wie Tabelle 2 zeigt, wurden fünf Lachsfilets mit je fünf NL und die restlichen fünf Filets mit je zehn NL versetzt. Die Lachsfiletstücke hatten je ein Gewicht von 180 g. Die Versuche am SWB mit den entsprechenden 1 Liter Prüfgefäßen wurden jedoch für 100 g Fischmasse optimiert. Aus diesem Grund mussten die zehn angefertigten Proben für das SWB pro Probe auf zwei Prüfgefäße aufgeteilt werden. Um zu testen, wie sich eine unterschiedliche Beschaffenheit des Filets auf die Ganzheit der NL auswirkt, wurden die Filets, die fünf NL enthielten, in einer Plastiktüte per Hand zerdrückt und diejenigen, die zehn NL enthielten, gepresst. Das gepresste Filet wurde im Anschluss aus den Tüten geschabt. Die Versuche wurden nach der entwickelten SWB-Methode durchgeführt.

## **5. Ergebnisse und Diskussion**

### **5.1 Vorversuche**

Für die VV I-V wurde Heringsfilet als Fischmasse benutzt. Es wurden die Heringe für die VV herangezogen, aus denen zuvor die NL für die anstehenden HV isoliert wurden. Bei allen Versuchen (VV, HV, sowie Tests) wurde die Menge des Rückstandes, die Anzahl der gefundenen NL, sowie die Anzahl der ganzen NL bzw. die Anzahl der Bruchstücke notiert.

Die VV I und III wurden im SWB mit der Intention durchgeführt, nach jeweils zwei, vier, sechs und acht Stunden den übrig gebliebenen Rückstand zu messen, um nachvollziehen zu können, wie der Digestionsvorgang in dieser Zeit vorangeschritten war. Der genaue Ablauf ist in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Dafür wurden bei beiden VV jeweils fünf Prüfgefäße mit einem Fassungsvermögen von einem Liter mit per Hand zerdrücktem Heringsfilet und einer entsprechenden Menge der Pepsin-HCl-Lösung gefüllt. Durch das häufige Umschütten des Prüfgefäßinhaltes für die Messungen war viel Bewegung innerhalb des Prüfgefäßes auszumachen, was zur Folge hatte, dass die Digestion dadurch beschleunigt wurde. Dies wird in Abbildung 6 deutlich. Es ist zu erkennen, dass die Rückstandsmenge nach jeder Messung gesunken ist und nach acht Stunden Digestion fast die gesamte Fischmasse verdaut wurde.

### **5.1.1 Vorversuch I: Unterschiedliche Verhältnisse Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung bei einer Rückstandsmessung vier Mal alle zwei Stunden**

VV I hatte in fünf Prüfgefäßen immer die gleiche Menge an zerdrückter Fischmasse mit unterschiedlichen Mengen an Pepsin-HCl-Lösung, um herauszufinden, wo die Digestion am weitesten fortgeschritten bzw. der geringste Rückstand aufzufinden war. Das Prüfgefäß-Nr. 2 mit einem Verhältnis von 100 g Heringsfilet zu 900 mL Pepsin-HCl-Lösung wies nach acht Stunden Digestionsprozess eine Rückstandsmenge von 2,6 g auf und lieferte somit das beste Ergebnis. Prüfgefäß-Nr. 6 enthielt den geringsten Anteil an Pepsin-HCl-Lösung. Das Verhältnis Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung betrug hierbei 100 g zu 500 mL. Prüfgefäß-Nr. 6 hatte im Vergleich die höchste Rückstandsmenge von 7 g. Die Prüfgefäße-Nr. 3-5 lagen mit den jeweiligen Ergebnissen der Rückstandsmengen zwischen den Ergebnissen von Prüfgefäß-Nr. 2 und Prüfgefäß-Nr.6 (s. Tabelle 10.1).

Infolgedessen wurde für weitere VV das Verhältnis 100g Fischfilet zu 900 mL Pepsin-HCl-Lösung ausgewählt.



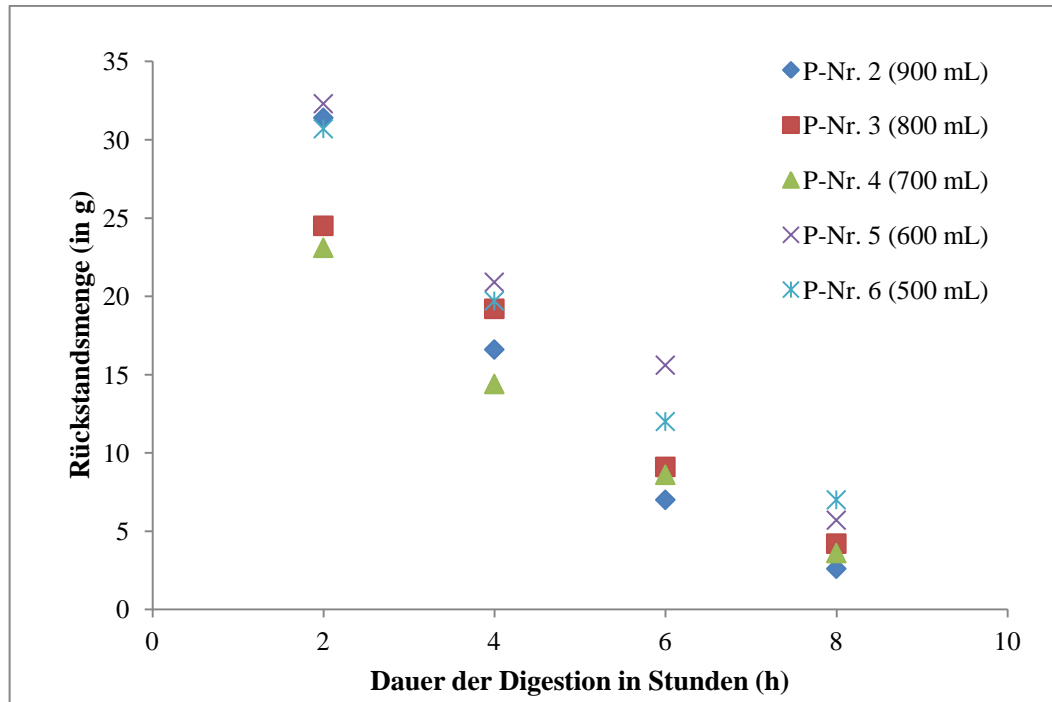


Abbildung 6: SWB-Digestion bei Vorversuch I (Messung vier Mal alle zwei Stunden): 100 g Heringsfilet in Abhängigkeit zu der Menge der Digestionslösung

### 5.1.2 Vorversuch III: Wiederholung des optimalen Verhältnisses aus Vorversuch I

Im VV III wurde geprüft, ob sich die positiven Ergebnisse aus VV I wiederholen ließen. Die Digestionsabläufe der einzelnen Prüfgefäße sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Prüfgefäße-Nr. 1-5 wiesen ein Verhältnis von 100 g Heringsfilet zu 900 mL Pepsin-HCl-Lösung auf, wohingegen Prüfgefäß-Nr. 6 mit einem Verhältnis von 100 g Heringsfilet zu 700 mL Pepsin-HCl-Lösung befüllt war. In VV I hatte sich gezeigt, dass bei diesem Verhältnis ebenfalls ein sehr geringer Rückstand von 3,7 g gemessen wurde. Bei den Prüfgefäßen-Nr. 1-5 wurde vier Mal alle zwei Stunden der Rückstand gemessen, wohingegen bei Prüfgefäß-Nr. 6 die erste Messung erst nach acht Stunden erfolgte, weswegen in der Abbildung nur ein Messwert zu erkennen ist. Bei der letzten Messung wurde zudem bei allen Prüfgefäßen darauf geachtet, dass die ins Gefäß gegebenen lebenden Nematodenlarven wiedergefunden wurden und ob diese nach dem Digestionsvorgang noch als ganz bewertet werden konnten. Das Ergebnis war, dass diese an manchen Stellen dünner waren oder kaputte Stellen aufwiesen, jedoch alle hinzugefügten NL wiedergefunden und als ganz beschrieben werden konnten.

Die Rückstandsmessungen ergaben, dass die Prüfgefäße, welche alle das Verhältnis 100 g Fischmasse zu 900 mL Pepsin-HCl-Lösung enthielten, sich insgesamt ähnlich verdauen ließen. Die Rückstandsmengen schwankten zwischen 0,8 g bei Prüfgefäß-Nr. 1 und 6,2 g bei Prüfgefäß-Nr. 2, jedoch war auch bei diesem VV zu vermerken, dass die Rückstandsmengen

mit der Dauer der Digestion sanken und fast die gesamte Fischmasse nach acht Stunden verdaut war (s. Tabelle 10.1).

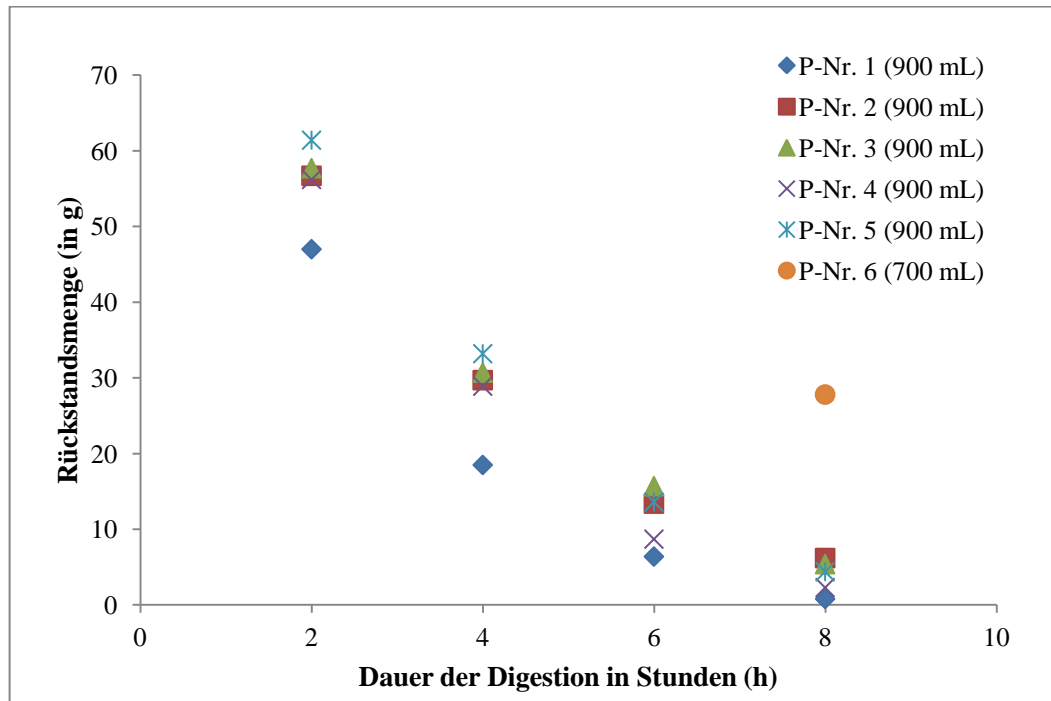


Abbildung 7: SWB-Digestion bei Vorversuch III (Messung vier Mal alle zwei Stunden): 100 g Heringsfilet in Abhängigkeit zu der Menge der Digestionslösung

Prüfgefäß-Nr. 6 zeigte im Vergleich zu den restlichen Prüfgefäßen einen deutlich höheren Rückstandswert von 27,8 g auf. Dies kann zum einen an dem geringeren Zusatz an Pepsin-HCl-Lösung liegen, zum anderen gab es keine zusätzliche Bewegung durch häufiges Umschütten des Prüfgefäßinhaltes. Eine verstärkte Bewegung innerhalb des Prüfgefäßes führte demnach zu einer verbesserten Digestion. Aus diesem Grund wurde in VV IV ein ovaler Rührfisch zugesetzt, der dafür sorgen sollte, dass die Digestion innerhalb des Prüfgefäßes beschleunigt wurde, um eine ähnliche Wirkung wie das Umschütten zu erzielen.

### 5.1.3 Vorversuch II: Unterschiedliche Verhältnisse Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung bei 14-stündiger Digestion

Die VV II und IV wurden über Nacht für 14 Stunden im SWB durchgeführt. Die Rückstandsmengen sind im Vergleich zu den Messungen, die vier Mal alle zwei Stunden durchgeführt wurden, etwas höher. Bei dem VV II wurden in die Prüfgefäße keine NL hinzugefügt, da bei diesem VV fünf unterschiedliche Mischungsverhältnisse von Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung untersucht wurden. Damit sollte herausgefunden werden, welches Mischverhältnis den geringsten Rückstandswert hervorbringt. Tabelle 3 zeigt auf, welche unterschiedlichen

Verhältnisse von Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung getestet wurden. Das Prüfgefäß-Nr. 1 testete ein vergleichbares Mischverhältnis, welches im Codex Standard 244-2004 Annex I festgelegt wurde. Es stellte sich die Frage, ob dieses Verhältnis auch bei der SWB-Methode anwendbar ist und zu optimalen Digestionsergebnissen führt. Zudem wurde in den Prüfgefäßen-Nr. 4 und 5 getestet, ob es möglich ist, in den eingesetzten 1 L Plastik-Prüfgefäßen auch 200 g Fischmasse verdauen zu lassen.

Tabelle 3: unterschiedliche Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung

Prüfgefäß-Nr.	Fischmasse (in g)	Pepsin-HCl-Lösung (in mL)
1	89	800
2	100	800
3	100	700
4	200	800
5	200	700

Die Ergebnisse zeigten, dass das der Digestion gemäß Codex Standard 244-2004 Annex I ähnliche Mischungsverhältnis von Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung positive Digestionsergebnisse lieferte. Die Rückstandsmenge betrug 6,1 g. Jedoch brachte das Mischverhältnis von 100 g Fischfilet zu 800 mL Pepsin-HCl-Lösung die geringste Rückstandsmenge hervor. In diesem Fall lag diese bei nur 5,4 g. Die Prüfgefäße-Nr. 4 und 5 wiesen im Vergleich weniger zufriedenstellende Ergebnisse auf. Im Schnitt waren noch fast 50 % der Fischmasse übrig. Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass das optimale Verhältnis von Fischmasse zu Pepsin-HCl-Lösung bei 1:8 bzw. 1:9 liegt.

#### 5.1.4 Vorversuch IV: Einfluss von Rührfischen

Für den VV IV wurden zehn 1 Liter Prüfgefäße mit dem gleichen Verhältnis von 100 g Heringfilet zu 900 mL Pepsin-HCl-Lösung befüllt und je Prüfgefäß zwei lebende NL zugesetzt. Der Unterschied zwischen den Prüfgefäßen lag darin, dass in den Prüfgefäßen Nr. 5-10 zusätzlich jeweils ein Rührfisch zugesetzt wurde. Die Idee war, dass durch den Rühreffekt im Prüfgefäß die Digestion zusätzlich unterstützt wird und deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit schneller abläuft. Um den zusätzlichen Rühreffekt überhaupt zu erzeugen, wurde eine ovale Form gewählt, da sich herausstellte, dass es die einzige Form eines Rührfisches war, die sich während des Schüttelns tatsächlich mitbewegte.

Abbildung 8 zeigt links ovale Rührfische. Rechts ist der länglich, eckige Rührfisch abgebildet. Dieser wurde bei den Versuchen am Magnetrührer dem Becherglas hinzugefügt.

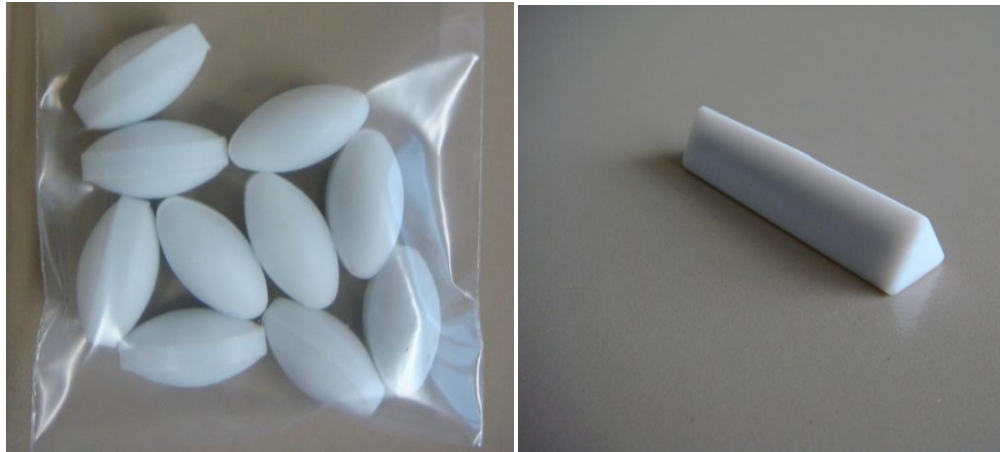


Abbildung 8: unterschiedliche Rührfische (li.: ovale Rührfische für Digestionsversuche mit SWB, re.: länglich, eckiger Rührfisch für Digestionsversuche mit Magnetrührer) (Quelle: eigene Bilder)

Nach der Messung wurden alle Nematodenlarven unbeschädigt, sprich im Ganzen und noch lebend, wiedergefunden. Dies zeigt, dass der Rührfisch keinen negativen Einfluss auf die Nematodenlarven hatte, diese also durch den Röhreffekt im Prüfgefäß nicht zerstört wurden. Zudem konnte die Vermutung bestätigt werden, dass es durch diesen Zusatz tatsächlich zu einer verbesserten Digestion kam. Im Durchschnitt war in den Prüfgefäßen-Nr. 6-10 ein Rückstand von 10,26 g auszumachen. In den Prüfgefäßen-Nr. 1-5 waren es im Schnitt 15,66 g. Dies entspricht einer Differenz von 5,4 g und damit eine deutlich verbesserte Digestion gegenüber den Prüfgefäßen, denen kein Rührfisch zugesetzt wurde (s. Tabelle 10.1). Aus diesem Grund wurde ein ovaler Rührfisch bei den folgenden Versuchen verwendet.

### 5.1.5 Vorversuch V: Verlängerte Digestionszeit SWB

Der VV V wurde über 14 Stunden durchgeführt. Da bei den anderen Versuchen über Nacht immer noch in geringen Mengen Rückstände vorhanden waren, war nun die Idee, das Wasserbad 14 Stunden über Nacht laufen zu lassen und am folgenden Morgen eine dreißigminütige Nachverdauung anzuschließen. Bei der Hälfte aller Prüfgefäße wurde das hinzugefügte Heringsfilet komplett verdaut, sodass beim Abgießen der Flüssigkeit über ein Sieb nur noch die NL zu sehen waren.

Tabelle 10.1 legt dar, dass der Durchschnitt der gemessenen Rückstandsmenge 0,48 g betrug. Die gefundenen NL wurden nach den Messungen bezüglich ihrer Ganzheit mikroskopisch untersucht. Alle NL waren ganz und wiesen nur geringe Verletzungen auf. Bei zwei der zehn Proben fanden sich sogar mehr NL, als ursprünglich hinzugetan wurden. Dies bedeutet, dass sich auf natürliche Weise vorher NL im Heringsfilet befunden haben. Auch durch diesen Faktor wird deutlich, dass es von Vorteil ist, wenn die Fischmasse komplett verdaut wird, da da-

durch ohne großen zeitlichen Aufwand die gesuchten NL ausfindig gemacht werden können. In zwei Prüfgefäßen wurden keine NL wiedergefunden. Mögliche Gründe dafür können sein, dass die NL mit verdaut wurden, beim Umschütten im Probengefäß geblieben sind, im Sieb nicht wiedergefunden oder durch das Sieb durchgespült wurden.

Ab VV VI-VIII, sowie für die Tests I und II am Magnetprüfer und die Tests I, II und III am SWB wurde Kabeljaufilet als Fischmasse benutzt, welcher ebenso wie der Hering tiefgekühlt war. Es sollte untersucht werden, wie sich der Kabeljau im Vergleich zum Hering verdauen lässt, d.h. wie sich Fische mit unterschiedlichem Fettgehalt für die Digestion einsetzen lassen.

### **5.1.6 Vorversuch VI: Einfluss Nachverdauung**

Auch der VV VI wurde mit einer Dauer von 14 Stunden durchgeführt. Es wurden zehn Prüfgefäße mit jeweils 100 g Fischmasse und 900 mL Pepsin-HCl-Lösung befüllt. Bei diesem VV wurde drauf verzichtet, nach den 14 Stunden Digestion noch einmal für 30 Minuten nachzuverdauen, da angenommen wurde, dass Kabeljau sich aufgrund des geringeren Fettgehalts im Vergleich zum Hering besser verdauen lässt. Es wurde eine relativ hohe Rückstandsmenge aufgefunden, womit sich diese Annahme als falsch erwies. Der in Tabelle 10.1 dargelegte Mittelwert des Rückstands betrug 8,22 g. Aufgrund der hohen Rückstandsmenge waren die NL schwer zu finden. Beim Kabeljau trat die Schwierigkeit auf, dass die Muskelfasern den NL sehr ähnelten und es trotz zum Teil wenig Rückstand enorm Zeit kostete, die NL ausfindig zu machen. Bei vier der zehn Prüfgefäße wurden keine NL wiedergefunden. Dafür konnten in einer Probe fünf statt der zwei hineingegebenen NL ausfindig gemacht werden. Da die Anzahl der zu findenden NL bekannt war, wurden manche Proben mehrfach kontrolliert bis die gesuchte Anzahl an NL aufgefunden wurde. Durch diesen Versuch hat sich folgende Annahme erneut bestätigt: Je besser der Digestionsprozess abläuft, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass NL wiedergefunden werden.

### **5.1.7 Vorversuch VII: Einfluss Nachverdauung auf die Ganzheit gefrorener NL**

Aus diesem Grund wurde VV VII angesetzt, welcher zeigen sollte, ob Kabeljau sich besser verdauen lässt, wenn das SWB nach den 14 Stunden nochmals für 30 Minuten angestellt wird. Bei diesem Versuch wurden dem Kabeljaufilet erstmals bereits gefrorene NL hinzugefügt. Bei diesem Versuch war es ebenfalls interessant zu überprüfen, ob die eingefrorenen NL nach dem Verdauungsprozess genauso wie die Lebenden ganz bleiben. Erst ab diesem VV konnten Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob die Digestion mit eingefrorenen NL ebenfalls erfolgreich ist. Es wurden, wie auch in den anderen VV, zehn Prüfgefäße mit jeweils 100 g

Fisch, zwei NL und 900 mL Pepsin-HCl-Lösung gefüllt. Die Verdauung lieferte positive Ergebnisse, da nur wenig Rückstand gemessen wurde. Der Mittelwert der Rückstandsmengen lag bei 0,37 g. Bei allen bisher durchgeführten VV war dies der niedrigste Rückstandswert. Die Wiederfindungsrate (WRF) der ganzen NL, welche in Tabelle 10.1 dargestellt ist, betrug 66,67 %, wobei alle NL Verletzungen aufwiesen. Der Rest der gefundenen NL waren Bruchstücke. In Bezug auf die Ganzheit der NL machte es folglich einen großen Unterschied, ob lebende oder bereits eingefrorene NL zur Digestion herangezogen wurden.

#### **5.1.8 Vorversuch VIII: Einfluss des Rührfisches auf die Ganzheit gefrorener NL**

Bei dem VV VIII sollte geprüft werden, ob die Mehrzahl der eingefrorenen NL den Digestionsvorgang ganz übersteht, wenn dem Prüfgefäß kein Rührfisch zugesetzt wird. Der Rührfisch könnte aufgrund des Gewichtes und der Schwingbewegung innerhalb des Prüfgefäßes einer der Gründe dafür sein, dass die eingefrorenen NL beschädigt werden.

Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass der Kabeljau im Vergleich zu vorherigen Versuchen mit einer durchschnittlichen Rückstandsmenge von 1,28 g zum einen eine hohe Rückstandsmenge hervorbrachte und zum anderen kaum ganze NL ausfindig gemacht werden konnten. Bis auf zwei ganze NL wurden nur Bruchstücke ausgezählt (s. Tabelle 10.1). Dass zudem weniger NL wiedergefunden wurden als in anderen VV, hing unter anderem mit der verschlechterten Digestion zusammen, da es bei dem vorhandenen Fischrückstand im Sieb schwierig war, die hinzugefügten NL zu erkennen. Die Vermutung, dass der Rührfisch die NL während des Digestionsprozesses zerstört hat, musste folglich falsifiziert werden. Aus diesem Grund wurden die Rührfische für weitere Versuche, sowie für die HV an Forelle und Lachs wieder verwendet.

#### **5.1.9 Stabilität von tiefgefrorenen NL in Abhängigkeit von der Digestionstemperatur**

Tabelle 4 zeigt die Temperaturabhängigkeit von gefrorenen NL, die unterschiedlichen Digestionsvorgängen am SWB den Forellen- und Kabeljaufilet zugesetzt wurden. Bei den Digestionsvorgängen mit Forellenfilet als Fischmedium war zu erkennen, dass die WFR von ganzen NL mit 41,8 % bei einer Temperatur von 30 °C deutlich höher war, als wenn der Digestionsvorgang bei 37 °C stattgefunden hatte, da die WFR ganzer NL bei dieser Temperatur lediglich 8,33 % betrug.

Bei den Digestionsvorgängen mit Kabeljaufilet als Fischmedium wurde dies erneut verdeutlicht. Bei einer Temperatur von 30 °C konnten 100 % der eingesetzten NL als ganz ausgezählt

werden. Bei 34,5 °C betrug die WFR ganzer NL 62,5 % und bei einer weiteren Temperaturerhöhung auf 37 °C sank die WFR auf 10 % (s. Tabelle 10.1).

Tabelle 4: WFR ganzer NL in % in Abhängigkeit zur Temperatur bei Forellen- und Kabeljaufilet

<b>Fischart</b>	<b>Temperatur in °C</b>	<b>Anzahl zuge-setzter NL (gefroren)</b>	<b>Anzahl gefundener ganzer NL</b>	<b>Anzahl gefundener Bruchstücke</b>	<b>WFR ganze NL in %</b>
Forelle	37	36	3	18	8,3
	30	91	38	50	41,8
Kabeljau	37	20	2	21	10
	34,5	16	10	10	62,5
	30	20	20	0	100

Dieser Vergleich zeigt zum einen, dass das Kabeljaufilet, welches das Filet eines Magerfisches ist, im Allgemeinen eine höhere WFR ganzer NL hervorbrachte als bei dem Einsatz von Forellenfilet, sprich dem Filet eines mittelfetten Fisches. Zum anderen kann festgehalten werden, dass die Temperatur einen sehr großen Einfluss auf die Ganzheit der eingefrorenen NL hatte. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die sehr empfindlichen, in gefrorenem Zustand in das Fischmedium eingearbeiteten NL bei geringer Digestionstemperatur eher ganz geblieben sind und weniger auseinandergerissen wurden als bei Digestionsvorgängen bei hoher Temperatur.

Die nachfolgende Abbildung 9 kann diese Feststellung vertiefen. Diese vergleicht den Einfluss lebender und toter NL bezogen auf die Ganzheit nach der Digestion mit dem SWB bei einer einheitlichen Temperatur von 37 °C. Dabei wurden die Werte der WFR ganzer NL aus drei VV erfasst. Für die Werte von den lebenden NL wurden die Ergebnisse aus VV VI verwendet. Für die Werte von den gefrorenen/toten NL wurden die Werte aus den VV VII und VIII herangezogen. Das Fischmedium war stets Kabeljaufilet.

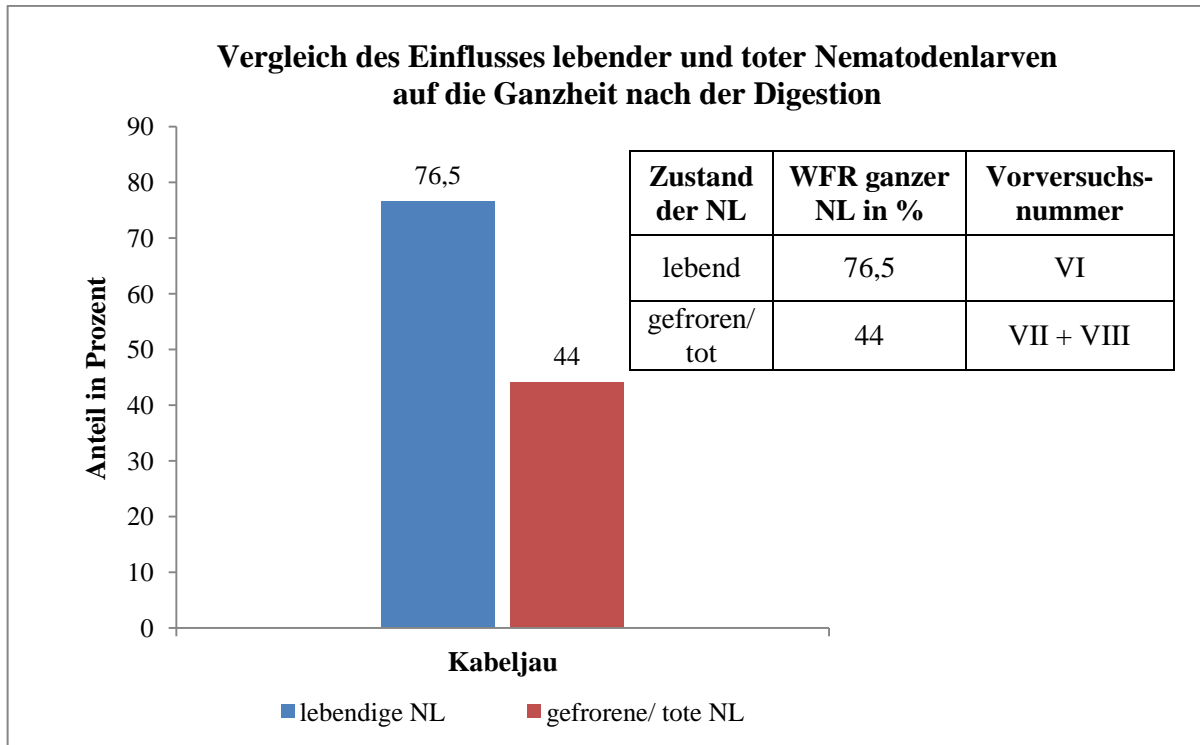


Abbildung 9: Vergleich des Einflusses lebender und toter NL auf die Ganzheit nach der Digestion in Prozent

Die WFR ganzer NL betrug für VV VI 76,47 %. Bei den VV VII und VIII wurden insgesamt 50 NL hinzugefügt, wovon 22 Ganze wiedergefunden wurden. Daraus ergab sich eine WFR ganzer NL von 44 % (s. Tabelle 10.1). Daraus wird deutlich, dass zur Digestion eingesetzte lebende NL öfter ganz geblieben sind als bereits eingefrorene NL, welche den Digestionsprozess seltener ganz überstanden haben. Es ist also schwieriger eine hohe WFR ganzer NL zu erreichen, die im gefrorenen Zustand die Digestion durchlaufen. Da die Untersuchungsämter jedoch immer gefrorene Filets und somit auch gefrorene NL testen, sollte es gelingen, trotz dieser Umstände bei der Digestion am SWB eine hohe WFR ganzer NL zu verzeichnen.

Abbildung 10 vergleicht die Rückstandsmenge in % mit der WFR ganzer NL in % für die VV II, IV 1., IV 2. und V. Dabei wurde für die Digestionsvorgänge am SWB immer Heringsfilet als Fischmedium eingesetzt. Dem Prüfgefäß wurden lebende NL hinzugefügt. Bei VV II war keine WFR ganzer NL zu verzeichnen, da keine hinzugefügt wurden. Die Rückstandsmenge ist bei VV II im Vergleich am höchsten. Dies kommt dadurch zustande, dass bei diesem Versuch unterschiedliche Fischmengen eingesetzt wurden (von 86-200 g), was bei den anderen Versuchen nicht der Fall war, da bei diesen stets 100 g Fischmasse eingesetzt wurden. Die WFR ganzer NL betrug bei VV IV 1. 120 %, da mehr ganze NL nach dem Digestionsvorgang wiedergefunden als ursprünglich hinzugefügt wurden. Die Rückstandsmenge betrug 15,66 %. Bei diesem VV wurde jedoch kein Rührfisch hinzugefügt. VV IV 1. und VV IV



2. lassen sich gut miteinander vergleichen, da bis auf den Zusatz eines Rührfisches pro Prüfgefäß dieselben Bedingungen galten. Der bei VV IV 2. hinzugefügte Rührfisch ist ein wahrscheinlicher Grund für die geringere Rückstandsmenge von 10,26 %. Es kann folglich festgehalten werden, dass der Rührfisch eine eindeutige Beschleunigung der Digestion bewirkt hat. Es ist jedoch zu erkennen, dass die WFR ganzer NL mit 90 % bei VV IV 2. deutlich geringer ist als bei VV IV 1. VV V weist im Vergleich mit nur 0,48 % die geringste Rückstandsmenge auf. Der Grund dafür war die entwickelte Methode, bei der die ursprüngliche 14-stündige Digestion um eine dreißigminütige Nachverdauung erweitert wurde. Da diese Methode optimale Rückstandswerte bei der angesetzten Versuchsreihe lieferte, wurde diese bei den folgenden Versuchen angewandt. Die WFR ganzer NL betrug 85 %. Dieser Wert ist von den vier Versuchen der geringste, jedoch ist dieser zu VV IV 2. um nur 5 % gesunken. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.1 zusammengefasst.

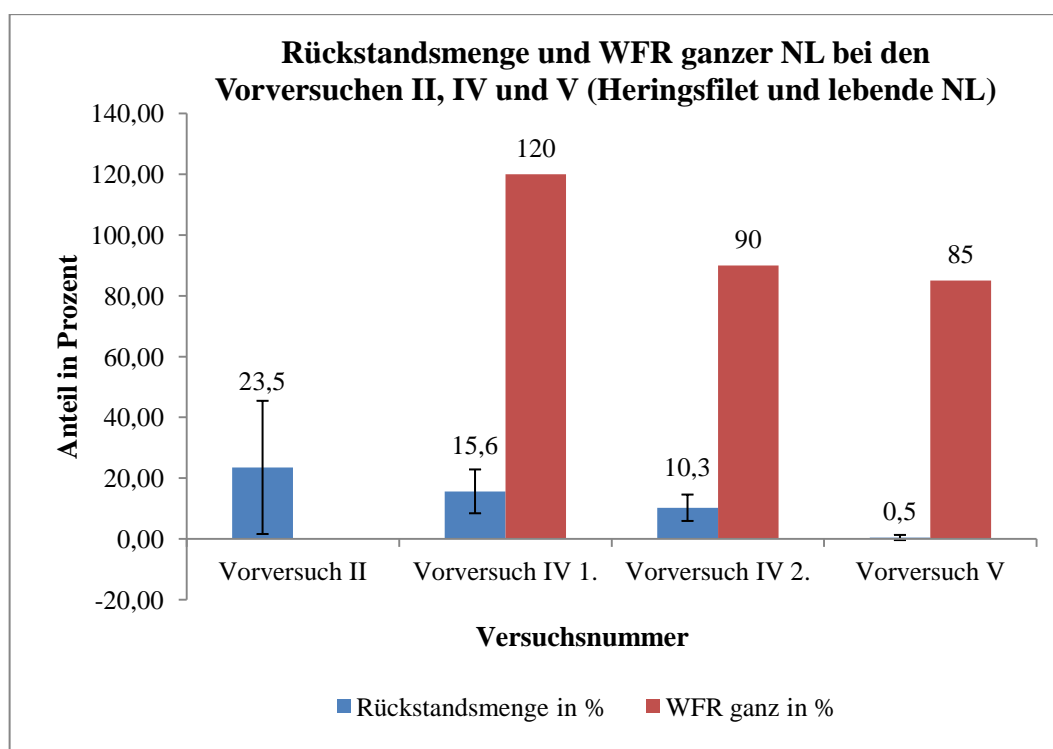


Abbildung 10: Rückstandsmenge und WFR ganzer NL bei den Vorversuchen II, IV und V in Abhängigkeit zu den Versuchsbedingungen im Mittelwert und Standardabweichung der Rückstandsmenge

Abbildung 11 vergleicht die Rückstandsmenge in % mit der WFR ganzer NL in % für die VV VI, VII und VIII. Als Fischmedium wurde Kabeljaufilet eingesetzt. Den Prüfgefäßen aus VV VI wurden lebende NL zugesetzt. Für die VV VII und VIII wurden gefrorene NL verwendet. Den Prüfgefäßen aus VV VIII wurde kein ovaler Rührfisch zugesetzt. Bei VV VI ist im Vergleich mit 8,22 % die höchste Rückstandsmenge zu verzeichnen. Die WFR ganzer NL ist bei

VV VI mit 76,47 % am höchsten. Bei VV VII ist mit 66,67 % und bei VV VIII mit 10 % eine geringere WFR zu verzeichnen. Diese Ergebnisse sind erneut dadurch zu erklären, dass lebende NL die Digestion besser und vor allem häufiger im Ganzen überstehen als gefrorene NL.

Die Rückstandsmenge betrug bei VV VII 0,37 % und bei VV VIII 1,28 %. Warum die Rückstandsmenge bei VV VII um ein Vielfaches geringer war als bei VV VI, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Vitalität der NL auf eine verbesserte Digestion keinen Einfluss genommen hat.

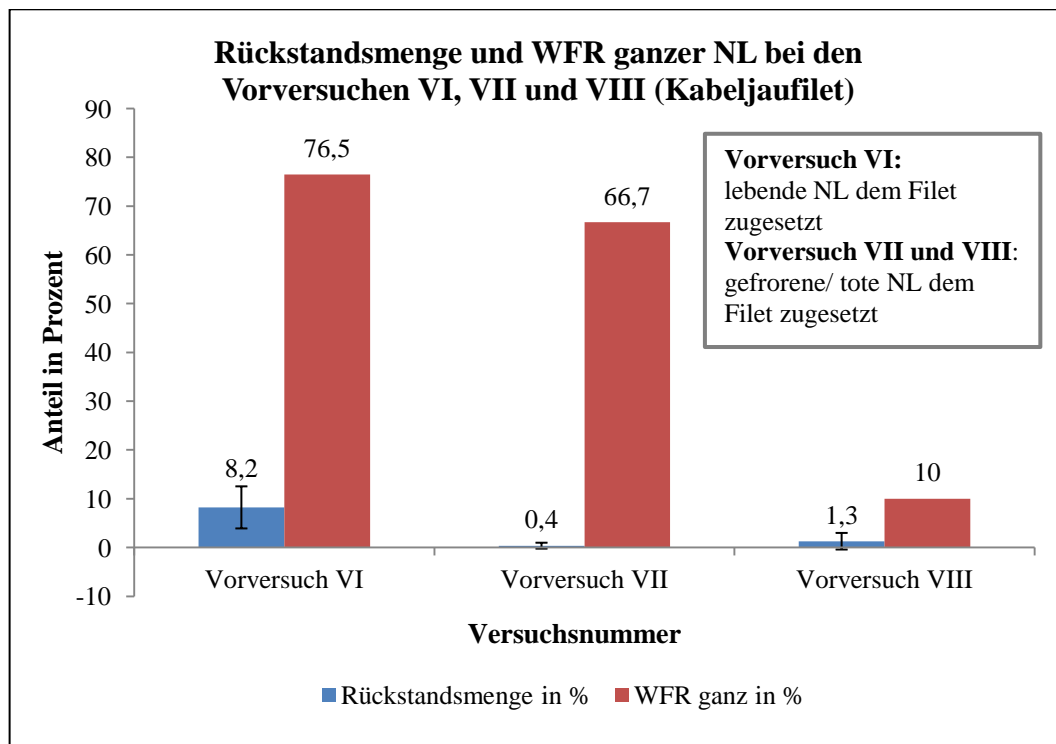


Abbildung 11: Rückstandsmenge und WFR ganzer NL bei den Vorversuchen VI, VII und VIII in Abhängigkeit zu den Versuchsbedingungen im Mittelwert und Standardabweichung der Rückstandsmenge

## 5.2 Tests

### 5.2.1 Tests am Magnetrührer

Zeitgleich wurden Tests am Magnetrührer durchgeführt. Bei der Digestion nach Codex Standard 244-2004 Annex I ergaben sich folgende Ergebnisse, welche Tabelle 10.2 zu entnehmen sind: Der Kabeljau wurde fast vollständig verdaut, was sich auch in dem Mittelwert von 0,8 g aus den beiden Ansätzen zeigte. Alle hinzugefügten NL wurden wiedergefunden und erwiesen sich nach mikroskopischer Untersuchung als ganz und weitestgehend unversehrt. Ein Zustand, der beim SWB nur bei lebenden NL auszumachen war.

Die Ergebnisse der beiden untersuchten Filets waren sehr zufriedenstellend, weshalb weitere acht Proben auf diese Weise verdaut wurden, um die Anzahl der untersuchten Forellen- und Lachsfilets auf eine statistisch verwertbare Anzahl von zehn Durchführungen zu erhöhen. Es sollte damit bewiesen werden, dass es sich bei dem ersten Versuch nicht um zufällige Ergebnisse handelte. Die WFR ganzer NL betrug bei allen Tests 100 %.

Der Magnetrührer zeigte an, dass die Heizplatte auf 35 °C aufgeheizt wurde. Nach 1 1/2 Stunden Laufzeit musste die Temperatur jedoch erhöht werden, da statt den eingestellten 35 °C tatsächlich nur 25 °C gemessen wurden. Nach zwei Stunden wurde eine Temperatur von 30 °C gemessen. Für weitere Tests wurden weitere acht Proben angesetzt und über zwei Stunden bei ungefähr 30 °C verdaut.

Temperaturschwankungen während des Digestionsprozesses waren an beiden Geräten unumgänglich, da eine konstante Einstellung der Temperatur an den verwendeten Magnetrührern nicht möglich war. Auch die folgenden Durchführungen lieferten durchaus positive Ergebnisse. Der durchschnittliche Rückstandswert betrug 2,3 g. Alle NL wurden wiedergefunden und wiesen kaum Verletzungen auf. Da eine Verdauungstemperatur von ca. 30 °C folglich zufriedenstellende Ergebnisse lieferte, wurde die Temperatur auch für weitere Versuche am SWB übernommen.

### **5.2.2 Tests am SWB**

Bei den Tests am SWB war es auffällig, dass bei einer Verdauungstemperatur von 34,5 °C nicht nur eine geringe Rückstandsmenge zu verzeichnen war, sondern eingefrorene NL die Digestion ohne Verletzungen überstanden haben. Es könnte folglich sein, dass die NL deswegen nur in Stücken wiedergefunden wurden, weil die Temperatur zu hoch war. Dadurch, dass diesmal homogenisierter Fisch verwendet wurde, wurden geringe Rückstandsmengen erwartet. Zudem kam die Vermutung im vorherigen Versuch (VV VIII) auf, dass die NL aufgrund ihres Zustands durch das Sieb durchgespült wurden, da die Maschenweite eventuell zu breit war. Aus diesem Grund wurde die verdaute Lösung über ein feineres Sieb mit einer Maschenweite von 1000 µm (= 1 mm) geschüttet, damit selbst zerstörte NL aufgefangen und quantitativ ausgezählt werden konnten.

Tatsächlich brachte diese Veränderung am SWB den erhofften Fortschritt. Von den insgesamt 20 NL waren 14 NL ganz geblieben. Wenn Stücke von NL gefunden wurden, dann passten diese zusammen, d.h. es wurde ein Anterior (Vorderteil) und ein Posterior (Hinterteil) gefunden.

Test SWB 2 sollte Aufschluss darüber geben, ob sich eine weitere Temperatursenkung positiv auf die Ganzheit der NL auswirken würde. Dafür wurde das SWB mit einer festgelegten Temperatur von 30 °C angestellt und als Fischmasse homogener Kabeljau benutzt. Die Digestion erbrachte einen durchschnittlichen Rückstandswert von 2,92 g. Alle hinzugefügten NL wurden wiedergefunden und nach der mikroskopischen Untersuchung konnte zudem bestätigt werden, dass alle NL ganz geblieben waren. Damit ergab sich für Test I eine WFR ganzer NL von 62,50 % und für Test II eine WFR von 100 %.

Test SWB 3 wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich auch nicht homogener Kabeljau, in diesem Falle mit der Hand zerrupftes Kabeljaufilet, mit der entwickelten SWB-Methode verdauen lässt. Auch bei diesem VV wurde eine Temperatur von 30 °C gewählt. Der VV zeigte, dass mit dieser Methode, welche einen noch geringeren Rückstandsmittelwert von 1,85 g hervorbrachte, alle NL nach der Digestion aufgefunden und als ganz bewertet werden konnten. Folglich ist festzuhalten, dass der Kabeljau sich bei dieser Einstellung am SWB optimal verdauen ließ und die NL unbeschadet blieben. Aus den genannten Gründen wurde diese Digestionseinstellung für die durchzuführenden HV verwendet. Zudem kam eine WFR ganzer NL von 100 % zustande (s. Tabelle 10.1).

## **5.3 Hauptversuche**

### **5.3.1 Hauptversuch I am SWB: Digestion von gespikten Forellenfilets bei 37 °C über 14 Stunden mit anschließender Nachverdauung**

Bei HV I wurden zehn der 24 für das SWB vorbereiteten Forellenfilets verwendet. Der Mittelwert der Rückstandsmenge betrug 1,98 g mit einer Standardabweichung von  $\pm 2,1$  %. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.1 zusammengefasst.

Von den insgesamt 36 eingearbeiteten NL konnten nur zwei Ganze wiedergefunden werden. Ansonsten wurden nur Bruchstücke auffindig gemacht.

Die WFR von ganzen NL war mit 8,33 % die niedrigste bei allen durchgeführten Versuchen. Mögliche Gründe für dieses Ergebnis könnten sein, dass die NL durch den Digestionsvorgang sehr schmal und zerstört waren, weswegen diese durch ein wahrscheinlich zu grobmaschiges Sieb gespült wurden. Für weitere Versuche wurde ein feinmaschigeres Sieb mit einer Maschenweite von einem Millimeter benutzt, um dies ausschließen zu können. Zudem könnte eine falsche Einstellung am SWB, wie zum Beispiel eine zu heiße Wassertemperatur, ein Faktor für die Zertrennung von ganzen NL gewesen sein. Aufgrund dessen wurde bei den folgenden Versuchen (Test I-III) eine niedrigere Wassertemperatur gewählt. Die NL könnten auch bereits bei der Probenvorbereitung zerstört worden sein, indem diese beim manuellen Zer-

pflücken der Filets zertrennt bzw. auseinander gerissen wurden. Hierfür wurden die restlichen vierzehn Filets, die für die HV am SWB eingeplant waren, einzeln in beschriftete Folien eingetütet und anschließend mithilfe einer Presse zerdrückt. Dadurch konnte das komplette Filet aus der Tüte in das Prüfgefäß geschabt werden. Hinzu kam der Vorteil, dass mit einer hohen Wahrscheinlichkeit alle NL mit ins Prüfgefäß gefüllt und diese nicht durch manuelles Zerrupfen bereits vor dem Digestionsvorgang zerstört wurden.

### **5.3.2 Hauptversuche I am Magnetprüfer**

#### **5.3.2.1 Digestion von gespikten Forellenfilets bei 30 °C über 2 Stunden**

Die HV I wurden mithilfe zweier Magnetprüfer durchgeführt. Die dafür angesetzten Forellen- und Lachsproben wurden nacheinander verdaut. Der durchschnittliche Rückstandswert aller Proben betrug 1,38 g, wie der Tabelle 10.2 zu entnehmen ist. Die Digestionstemperatur schwankte bei allen gemessenen Werten zwischen 29,2 und 31,3 °C. Abbildung 12 veranschaulicht, dass insgesamt 114 ganze NL der insgesamt hinzugefügten 127 NL wiedergefunden wurden. Daraus ergibt sich eine WFR von 89,8 %. Nur zwei NL wurden nicht wiedergefunden. Insgesamt waren neun Bruchstücke zu verzeichnen. Davon waren zwei Anterior (Kopfstück) und sieben Posterior (Schwanzstück). Es ist hinzuzufügen, dass allein fünf der gefundenen Posterior und eine der beiden insgesamt gefundenen Anterior in den beiden Proben gefunden wurden, welche mit bereits eingefrorenen NL versetzt waren (die Proben, die in Tabelle 1 mit einem Sternchen markiert waren). Dass bei diesen Proben Bruchstücke zu finden waren, war zu erwarten, da in den VV deutlich wurde, dass die Stabilität von eingefrorenen NL eindeutig geringer ist als die von lebenden NL.

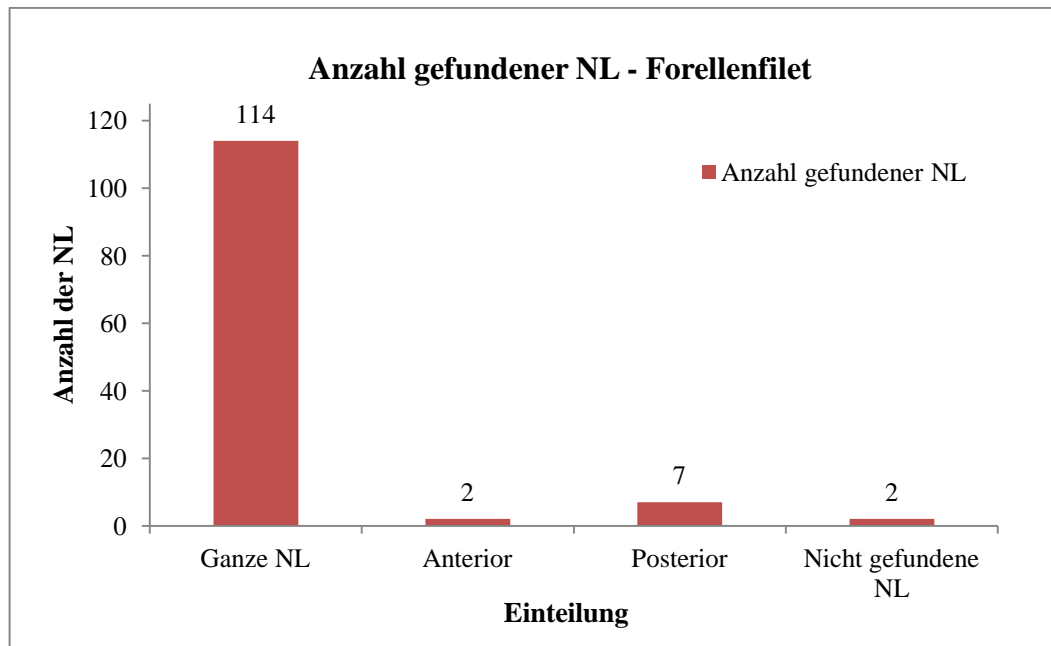


Abbildung 12: Anzahl gefundener gefrorener NL aus Versuchen mit Magnetrührer an Forellenfilet

### 5.3.2.2 Digestion von gespikten Lachsfilets bei 30 °C über 2 Stunden

Die zehn Lachsproben wiesen im Mittelwert eine Rückstandsmenge von 1,23 g auf. Die Digestionstemperatur schwankte zwischen 27,2 und 29,6 °C. Die nachfolgende Abbildung 13 zeigt die Verteilung der gefundenen NL auf die vier festgelegten Bereiche.

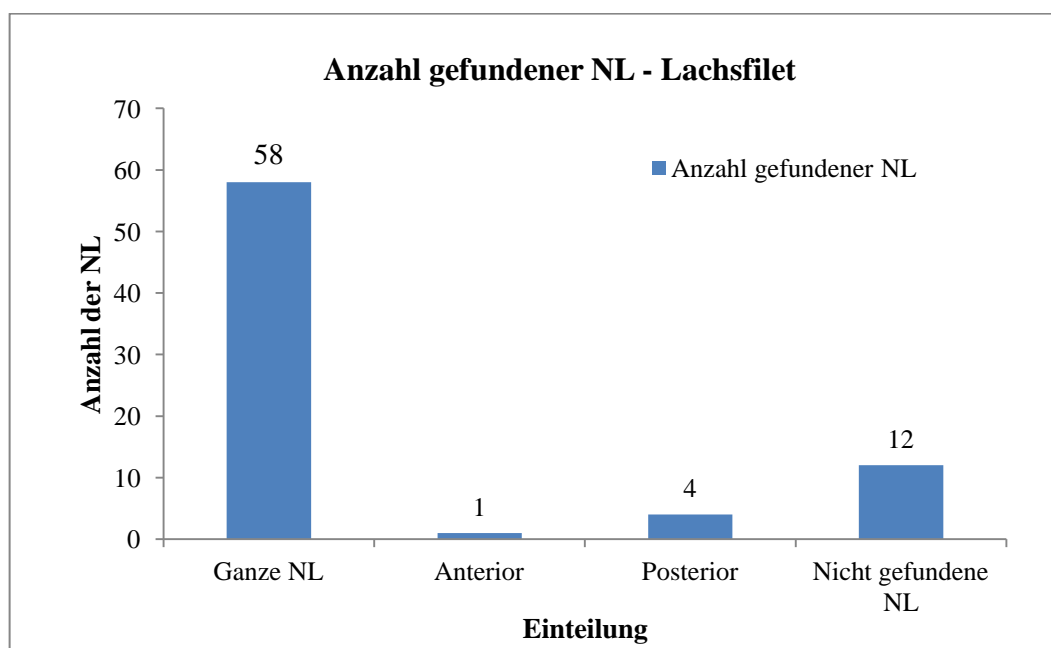


Abbildung 13: Anzahl gefundener gefrorener NL aus Versuchen mit Magnetrührer an Lachsfilet

Von den insgesamt 75 hinzugefügten NL wurden 58 ganze NL, ein Anterior und vier Posterior wiedergefunden. Nach dem Digestionsvorgang fehlten zwölf NL.

Bei der Hälfte der Proben, die je Filet fünf NL enthielten, wurden 24 NL wiedergefunden und erwiesen sich nach mikroskopischer Untersuchung als ganz. Bei der anderen Hälfte der Proben, die je Filet zehn NL enthielten, wurden insgesamt 39 NL wiedergefunden. 34 wurden als ganz, vier als Posterior und eine als Anterior gewertet. Es ist demnach deutlich zu erkennen, dass die Proben, die nicht gepresst, sondern grob zerdrückt wurden, bessere Ergebnisse bezüglich der Ganzheit der NL aufwiesen. Die relativ hohe Anzahl an nicht gefundenen NL kann größtenteils darauf zurückgeführt werden, dass aufgrund der Dicke des Lachsfilets die Presse Probleme hatte, das Filet zu plätten. Aufgrund eines zu hohen Druckes ist eine mit Lachsfilet befüllte Plastiktüte geplatzt, wodurch Filetstücke verloren gegangen sein können.

### **5.3.3 Hauptversuche II am SWB**

#### **5.3.3.1 Digestion von gespikten Forellenfilets bei 30 °C über 14 Stunden mit anschließender Nachverdauung**

Für den HV II wurden die restlichen vierzehn Forellenfilets herangezogen. Die Digestion an sich brachte sehr zufriedenstellende Ergebnisse, da mit einem durchschnittlichen Rückstandswert von 0,19 g fast alles verdaut wurde. Im direkten Vergleich zu HV I, bei dem die ersten zehn Forellenfilets verdaut wurden, wurden bei diesem Versuch am SWB gepresste Forellenfilets benutzt und nicht per Hand zerrupfte. Dieser Vergleich macht deutlich, dass sich gepresstes Forellenfilet deutlich schneller verdauen ließ. Trotz optimaler Digestionswerte waren die NL sehr zerstört und nur ein paar der eingearbeiteten NL konnten als Ganze gezählt werden. Von den 91 hinzugefügten NL wurden 38 als ganz identifiziert. Das entspricht einer WFR von 41,76 % (s. Tabelle 10.1). Im Vergleich zu den VV mit identischen Bedingungen am Kabeljau ist dies eine eindeutige Verschlechterung. Es kann hier folglich festgehalten werden, dass sich der mittelfette Fisch nicht so optimal unter diesen gegebenen Bedingungen verdauen ließ wie der magere Kabeljau.

Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass der Verdauungsvorgang über einen zu langen Zeitraum abgelaufen ist. Die überdurchschnittlich geringen Werte der Digestion weisen darauf hin, dass die Verdauung zu einem früheren Zeitpunkt hätte gestoppt werden müssen, um zu verhindern, dass die NL zerstört werden.

### **5.3.3.2 Digestion von gespikten Lachsfilets bei 30 °C über 14 Stunden mit anschließender Nachverdauung**

Zu dem HV II gehörten zudem die Digestionsversuche am Lachsfilet, welche in zwei Durchgängen durchgeführt wurden. Zunächst wurden die fünf gepressten Proben, welche jeweils zehn NL enthielten, verdaut. Bei der Auswertung wurde deutlich, dass die Digestion an sich sehr weit fortgeschritten war, denn die Rückstandsmenge betrug bei allen Proben 0 g. Auch dieser Fakt spricht dafür, dass die Digestion zu lange durchgeführt wurde. Die Ergebnisse bezüglich der Ganzheit der NL, welche in Tabelle 10.1 zusammengefasst sind, bestätigten diese Annahme, da von 50 NL nur 9 ganze NL gefunden wurden. Dies ergibt für ganze NL eine WFR von 18 %. Auch hier wurden die NL im Zuge der vorangeschrittenen Digestion zerstört.

Der zweite Digestionsdurchgang der Lachsfilets brachte ähnliche Ergebnisse. Hierfür wurden die restlichen fünf Proben verwendet, welche mit der Hand zerdrückt und je Probe mit fünf NL versetzt wurden. Obwohl zum Teil sehr grobe Lachsstücke in das Prüfgefäß gegeben wurden, betrug auch bei diesem Versuch die durchschnittliche Rückstandsmenge 1,42 g. Dies zeugt davon, dass der Lachs sehr schnell und ausreichend verdaut wurde. Bei diesem Versuch waren auch große Fischstücke kein Hindernis für eine zufriedenstellende Verdauung. Die WFR ganzer NL belief sich auf 28 %, da von 25 eingearbeiteten NL nur sieben ganze wiedergefunden werden konnten.

### **5.3.4 Abschließende Bemerkungen zu den Hauptversuchen**

Werden nun abschließend die drei Fischarten (Kabeljau, Forelle und Lachs) mit unterschiedlichem Fettgehalt miteinander verglichen, ist deutlich zu erkennen, dass der magere Kabeljau kaum Rückstandsmengen verzeichnen ließ und zudem die NL den Digestionsprozess unbeschadet und in großer Anzahl überstanden haben. Der fette Lachs und die mittelfette Forelle ließen sich ebenfalls schnell und fast vollständig, auch in einer zum Teil groben Struktur, verdauen. Bei dem Lachs war jedoch deutlich zu erkennen, dass die Ergebnisse was die Ganzheit der NL anbelangte stark davon abhängig waren, ob die Fischmasse mit der Hand grob zerstückelt oder fein gepresst wurde. Je mehr die Fleischmasse an Struktur verloren hatte, desto weniger ganze NL konnten ausfindig gemacht werden. So betrug bei dem gepressten Lachs die WFR von ganzen NL 18 %, was die zweitschlechteste WFR bei allen Versuchen war. Die per Hand zerdrückten Lachsfilets wiesen eine WFR von 28 % auf. Bei dem ersten HV an der Forelle, welcher mit per Hand zerdrücktem Filet durchgeführt wurde, kam die schlechteste



WFR aus allen Versuchen hervor. Diese betrug gerade einmal 8,33%. Obwohl im HV II geplättete Forellenfilets zur Digestion herangezogen wurden, war die WFR mit 41,76 % um einiges besser. Es ist davon auszugehen, dass geplättete Filets sich nicht nur besser und schneller verdauen lassen, sondern dadurch auch mehr NL zerstört werden und weniger ganze NL ausgezählt werden können. Die Vermutung, dass bei mittelfetten und fetten Fischen die Digestion mit geplätteten Filet schneller abläuft jedoch mit einer verminderten WFR ganzer NL, ist jedoch trotzdem nicht falsch. Bei HV I wurde diesbezüglich noch unter anderen Bedingungen gearbeitet, wie zum Beispiel das Zerpfücken per Hand, wobei bereits dort eventuell schon NL zerstört wurden, zudem wurde ein grobmaschigeres Sieb benutzt, durch das bereits verletzte aber eventuell noch ganze NL durchgespült werden konnten.

Abbildung 14 vergleicht abschließend die Rückstandsmengen in % und die WFR ganzer NL in % von den HV am SWB und am Magnetrührer. Wird die Rückstandsmenge betrachtet, liefern sowohl das SWB als auch der Magnetrührer sehr geringe Rückstandsmengen von nicht mehr als 1,32 %. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die neu entwickelte Methode am SWB zufriedenstellende Ergebnisse liefert, was die Rückstandsmenge anbelangt. Es ist jedoch auffällig, dass bei beiden Methoden das Lachsfilet als verwendetes Fischmedium noch geringere Werte aufzeigt als das Forellenfilet.

Bei der WFR ganzer NL klaffen die Ergebnisse von SWB und Magnetrührer weit auseinander. Die WFR ist bei dem SWB um ein Vielfaches geringer als bei der Digestion mit dem Magnetrührer, da bei der Digestion am Magnetrührer eine WFR ganzer NL von 89,76 % im Forellenfilet erreicht wurde, wohingegen es bei dem SWB nur 32,28 % ganze NL wiedergefunden wurden. Es ist im Allgemeinen zu erkennen, dass je höher die Rückstandsmenge ist, desto mehr ganze NL konnten wiedergefunden werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass je mehr Fischfilet verdaut wird, auch mehr NL bei der Digestion zerstört werden.

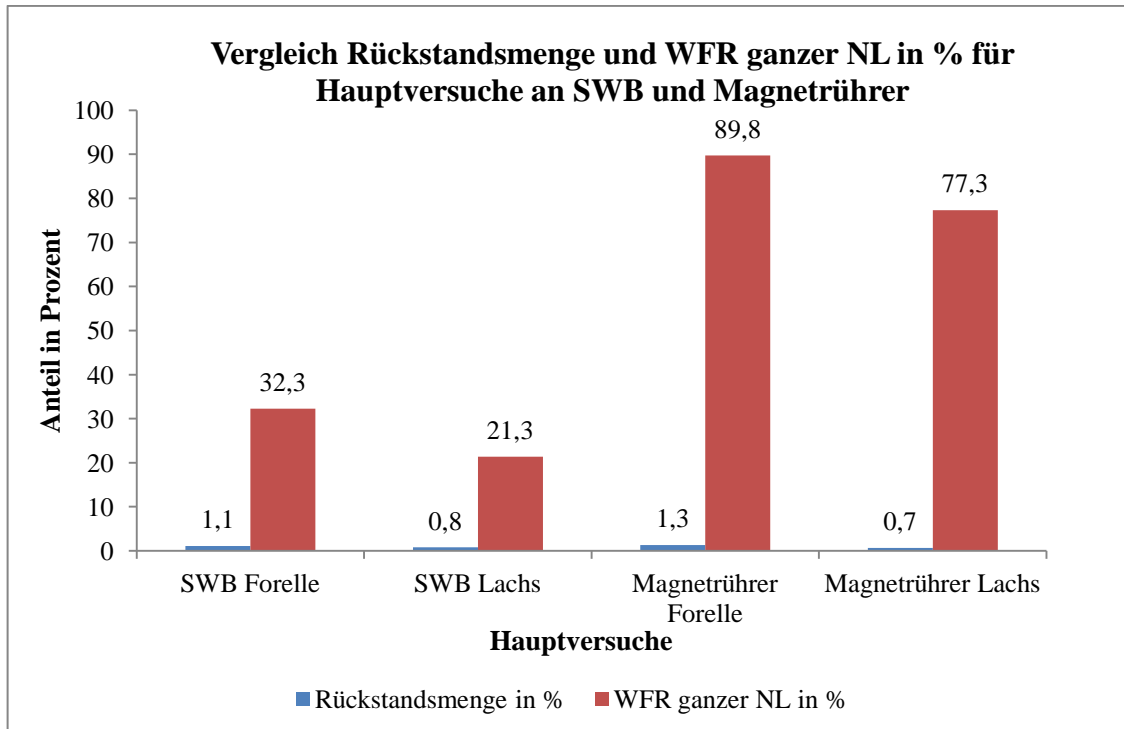


Abbildung 14: Vergleich Rückstandsmenge und WFR ganzer NL in % für Hauptversuche an SWB und Magnetrührer

## 6. Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die neu entwickelte Digestionsmethode mithilfe eines Schüttelwasserbads erreichen kann, dass gefrorene NL nach dem Digestionsprozess ganz bleiben und somit quantitativ auszählbar sind.

Die VV am SWB ergaben, dass das Mischverhältnis von 100 g zerdrückter Fischmasse zu 900 mL Pepsin-HCl-Lösung nach dem Digestionsvorgang die geringste Rückstandsmenge hervorbrachte. Aufgrund dessen wurde ab VV III für die nachfolgenden Messungen dieses Mischverhältnis verwendet. Zudem stellte sich heraus, dass durch den Einsatz eines Rührfisches die Rückstandsmenge reduziert werden kann. Dies zeigte VV IV, da die mittlere Rückstandsmenge im Vergleich um 1/3 gesenkt werden konnte, ohne dass sich die zusätzliche Bewegung innerhalb des Prüfgefäßes negativ auf die Ganzheit der NL ausübte. Um geringere Rückstandsmengen zu erreichen, wurde ab VV V an die vierzehnstündige Digestion eine dreißigminütige Nachverdauung angehängt.

Die Tests I-III machten deutlich, dass eine Temperatursenkung von 37 °C auf 30 °C auch bei Verwendung von grob zerpfücktem Kabeljaufilet für einen positiven Effekt in Bezug auf die Ganzheit der NL sorgte.

Die neue Methode brachte bezogen auf die WFR ganzer NL und die Rückstandsmenge für den Kabeljau optimale Ergebnisse. Bei Test III, welcher bei einer Digestionstemperatur von 30 °C durchgeführt wurde, konnte eine WFR ganzer NL von 100 % und eine Rückstandsmenge von 1,85 g der ursprünglichen Fischmasse von 100 g verzeichnet werden. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Digestion am SWB mit den festgelegten Einstellungen für Magerfische sehr gut geeignet ist.

Ein Vorteil des Schüttelwasserbads ist, dass bis zu fünfzehn Prüfgefäße gleichzeitig für die Digestion eingesetzt werden können. Die Digestion kann ohne nötige Kontrolle über Nacht ablaufen. Die angezeigte Temperatur entsprach exakt den festgelegten Einstellungen. Schwankungen bei der Temperatur können folglich ausgeschlossen werden. Auch die Schüttelgeschwindigkeit war bei sämtlichen durchgeführten Versuchen konstant.

Bei den HV wurde deutlich, dass das Ziel dieser Arbeit bei der Digestion am SWB nicht erreicht werden konnte. Die WFR ganzer NL bei den Forellenfilets als Fischmedium betrug 32,28 %. Bei den HV am Lachsfilet lag die WFR ganzer NL sogar noch 11 % niedriger. Es ist auffällig, dass die WFR ganzer NL bei steigendem Fischfettgehalt sinkt. Es zeigte sich zudem, dass die Lachsproben, die nicht gepresst, sondern grob zerdrückt wurden, bessere Ergebnisse bezüglich der Ganzheit der NL aufwiesen.

Zudem ist zu beachten, dass je mehr Fischmasse verdaut wurde, desto weniger ganze NL konnten wiedergefunden werden. Das legt die Vermutung nahe, dass die Digestion zum Beispiel bei dem Forellen- und Lachsfilet über einen zu langen Zeitraum abgelaufen ist und die NL dadurch zerstört wurden.

Um eine gleichwertige Digestion mit geringer Rückstandsmenge und einer hohen WFR ganzer NL ebenfalls bei Fischen mit mittlerem und hohem Fettgehalt zu garantieren, müssen weitere Tests am SWB durchgeführt werden.

Es muss festgehalten werden, dass die WFR ganzer NL jedoch auch stark davon abhängt, ob lebende oder gefrorene NL in den zu verdauenden Fischmuskel eingesetzt werden. Im direkten Vergleich wurde dies bei VV VI und VII deutlich. Den Prüfgefäßen in VV VI wurden lebende, den Prüfgefäßen in VV VII gefrorene NL hinzugefügt. Die WFR ganzer NL betrug bei VV VI 76,47 % und bei VV VII 66,67 %.

Die hohen Anschaffungskosten eines Schüttelwasserbads in der verwendeten Größe kann als Nachteil angeführt werden, weil es nicht zum allgemeinen Laborbestand gezählt werden kann. Die lange Laufzeit und die daraus resultierende Verzögerung bei den Ergebnissen kann als weiterer Nachteil angesehen werden.

Bei einem Magnetprüher kann die Verzeichnung zuverlässiger Ergebnisse bei der Ganzheit der NL nach der Digestion zu den Vorteilen gezählt werden, wenn eine Temperatur von 30 °C und eine Rührgeschwindigkeit von 420 rpm eingehalten wird. Durch eine Digestionszeit von nur zwei Stunden liefert diese Methode schnelle Ergebnisse. Zudem gehören Magnetprüher zu einer allgemeinen Ausstattung eines Labors, weswegen meist keine weiteren Anschaffungskosten anfallen.

Im HV konnte bei der Digestion der Forellenfilets eine WFR von 89,76 % und bei der Digestion von Lachsfilets eine WFR von 77,34 % ganzer NL verzeichnet werden. Die mittlere Rückstandsmenge betrug bei den beiden HV nicht mehr als 1,32 %. Diese Ergebnisse sind durchaus zufriedenstellend und für Fische mit unterschiedlichem Fettgehalt reproduzierbar. Gemäß Codex Standard 244-2004 Annex I wird eine Temperatur von 37 °C vorgeschrieben, jedoch zeigte sich in den Tests, dass eine Temperatur von 30 °C optimale Ergebnisse lieferte. Ein Nachteil der für die Tests und HV verwendeten Magnetprüher war, dass es relativ groÙe Schwankungen bei den Temperatureinstellungen gab, was es erschwerte hat, die angestrebte Temperatur von 30 °C zu erreichen bzw. konstant einzuhalten. Eine ständige Kontrolle der Temperatur war erforderlich. Bei anderen Geräten muss dies allerdings nicht zwangsläufig von Nöten sein.

## 7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Digestionsmethode mithilfe eines Schüttelwasserbads entwickelt, die erreichen sollte, dass gefrorene Nematodenlarven nach dem Digestionsprozess von Fischmuskeln ganz bleiben, da die Nematodenlarven bei der üblicherweise durchgeführten Digestion gemäß Codex Standard 244-2004 Annex I mithilfe von Magnetrührern häufig zerteilt werden.

Die Vorversuche I-V wurden mit per Hand zerkleinertem Heringsfilet mit der Intention durchgeführt, die optimalen Einstellungen am Schüttelwasserbad für die Digestion der Hauptversuchsproben zu finden. Dabei wurde deutlich, dass das Mengenverhältnis von 100 g Fischmasse zu 900 mL Pepsin-HCl-Lösung die geringste Rückstandsmenge hervorbrachte, weswegen dieses Mischverhältnis für die nachfolgenden Versuche als Richtwert verwendet wurde. Zudem stellte sich heraus, dass die Rückstandswerte weiter gesenkt werden konnten, indem die vierzehnstündige Digestion mit einer dreißigminütigen Nachverdauung verlängert wurde. Für eine weitere Senkung der Rückstandsmengen wurde den Prüfgefäßen je ein ovaler Rührfisch zugesetzt, der für eine zusätzliche Bewegung sorgte, die Ganzheit der NL jedoch nicht beeinflusste.

Die drei Tests mit Kabeljaufilet machten deutlich, dass mit einer Temperatursenkung von 37 °C auf 30 °C bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 138 min<sup>-1</sup> die Wiederfindungsrate ganzer Nematodenlarven auf 100 % gesteigert werden konnte und die Rückstandsmengen sich im Schnitt nicht veränderten.

Die besten Ergebnisse bei den Hauptversuchen lieferte mit Abstand die Digestion mithilfe des Magnetrührers. Es wurde jedoch nicht die gemäß Codex Standard 244-2004 Annex I vorgeschriebene Digestionstemperatur von 37 °C, sondern eine Temperatur von 30 °C gewählt. Die Digestion erfolgte über zwei Stunden mit einer Rührgeschwindigkeit von 420 rpm. Die Wiederfindungsrate ganzer Nematodenlarven aus Forellenfilets betrug 89,76 %, bei der Digestion der Lachsfilets konnte eine Wiederfindungsrate ganzer Nematodenlarven von 77,34 % verzeichnet werden. Die Rückstandsmengen wichen nicht nennenswert von den Ergebnissen des Schüttelwasserbads ab.

Das Schüttelwasserbad konnte in den Hauptversuchen nicht ansatzweise so überzeugende Resultate wie die Hauptversuche am Magnetrührer erzielen. Die Wiederfindungsrate ganzer Nematodenlarven betrug bei den Forellenfilets 32,28 % und bei den Lachsfilets 21,34 %. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Digestion am Schüttelwasserbad für Kabeljau optimale

Ergebnisse hervorbringt, jedoch mit steigendem Fettgehalt des Fisches die Ganzheit der Nematodenlarven abnimmt.

Für nationale Referenzlaboratorien oder Untersuchungsämter, die Nematodenlarven in gefrorenen Fischfilets nachweisen müssen, ist zu empfehlen, dass diese mit der bekannten Digestionsmethode mithilfe von Magnetrührern arbeiten. Wenn die Digestion mit einer niedrigeren Temperatur von 30 °C durchgeführt wird, können optimale Ergebnisse bezüglich der Wiederfindungsrate ganzer Nematodenlarven und der Rückstandsmenge bei Fischarten unterschiedlichen Fettgehaltes erzielt werden.

## 8. Abstract

In this work a method of digestion with the aid of a shaking water bath was developed to achieve that frozen nematode larvae remain intact after the process of digestion from fish muscles, because nematode larvae are often separated when being digested after Codex Standard 244-2004 Annex I with the aid of a magnetic stirrer.

The pretrial I-V were implemented with per hand ripped herring filet with the intention to discover optimum settings on the shaking water bath for the digestion of the main experiments samples.

In the course of this it became clear that the proportion of 100 g fish mass to 900 mL pepsin-hydrochloric acid-solution showed up the least amount of residue which is why this mixture ratio was used for further trials. Furthermore, it turned out that the amount of residue could be reduced further when the digestion lasting for 14 hours was expanded by a thirty-minute post-digestion. For a further reduction of the amount of residue test vessels was added each an oval stirring bar, which caused an additive movement, but having no effect on the wholeness of the nematode larvae.

The three tests with codfish filet made clear, that the retrieval rate for whole nematode larvae rose up to 100 % with a temperature reduction from 37 °C to 30 °C and with a shaking speed of 138 min<sup>-1</sup>. On average, the amount of residue did not change. Comparing the results from the main experiments the digestion with the aid of a magnetic stirrer provides by far the best results. In difference to Codex Standard 244-2004 Annex I there was not chosen the prescribed digestion temperature of 37 °C, but a temperature of 30 °C. The digestion was about two hours with a stirring speed of 420 rpm. The retrieval rate for whole nematode larvae from trout filet was 89.76 %, with the digestion of salmon filet it was 77.34 %. The amount of residue did not deviate significant from the results of the shaking water bath.

In comparison, the shaking water bath could not reach such convincing results as the main experiments from the magnetic stirrer. The retrieval rate for whole nematode larvae from trout filet amounted to 32.28 % and from salmon filet 21.34 %. These results suggest that the digestion with the aid of a shaking water bath for cod bears ideal results. However, the entirety of the nematode larvae decreases with an increasing fat rate of the fish.

For National Reference Laboratories or diagnostic laboratories, which have to detect nematode larvae in frozen fish filet is to be recommended that they work with the established method with the aid of magnetic stirrers.

When the digestion is proceeded with a temperature of 30 °C, ideal results regarding to the retrieval rate for whole nematode and the amount of residue for fish species with varying fat rate can be made.



## 9. Quellenverzeichnis

Bilsing, A.; Börstler, A.; Dietze, J.; Firtzlaff, K.-H.; Goldberg, A.; Klawitter, E. et al. (2004a): Evolution und biologische Vielfalt. Konkurrenz - Symbiose - Karpose - Antibiose. In: W. Probst und P. Schuchardt (Hg.): *Biologie-Abitur*. Berlin, Frankfurt a.M: PAETEC, Verl. für Bildungsmedien (Duden Basiswissen Schule), S. 310–316.

Bilsing, A.; Börstler, A.; Dietze, J.; Firtzlaff, K.-H.; Goldberg, A.; Klawitter, E. et al. (2004b): Ökologie. Biotische Umweltfaktoren. In: W. Probst und P. Schuchardt (Hg.): *Biologie-Abitur*. Berlin, Frankfurt a.M: PAETEC, Verl. für Bildungsmedien (Duden Basiswissen Schule), S. 401–403.

Biodiversität und Klima Forschungszentrum (BiK-F) (2012): *Wo ein Wurm ist, ist auch ein Wal. Erstes Verbreitungsmodell von Meeresparasiten liefert aufschlussreiche Einblicke*. Online verfügbar unter [http://www.bik-f.de/files/press/bikf\\_pi\\_fischparasiten\\_240112\\_d\\_\\_134144.pdf](http://www.bik-f.de/files/press/bikf_pi_fischparasiten_240112_d__134144.pdf), zuletzt geprüft am 18.04.2014.

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) (o.J.): *Zoonosen: Gesundheitliche Bewertung*. Online verfügbar unter <http://www.bfr.bund.de/de/zoonosen.html>, zuletzt geprüft am 18.04.2014.

Bundesverband der deutschen Fischindustrie und des Fischgroßhandels e.V. (Hg.) (2005): *Leitlinien für eine gute Hygienepaxis und für die Anwendung der Grundsätze des HACCP - Systems für das Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von Fischereierzeugnissen*. Online verfügbar unter <http://www.fwvsh.de/pdf+downloads/LeitfadenFischhygiene%202006.pdf>, zuletzt geprüft am 18.04.2014.

Carl Roth GmbH + Co. KG (o.J.): *Pepsin*. Online verfügbar unter <http://www.carlroth.com/catalogue/catalogue.do?favOid=000000030002dca100020023&act=showBookmark&lang=de-de&market=AT>, zuletzt geprüft am 18.04.2014.

Codex Alimentarius Commission (o.J.a): *Codex Alimentarius: List of Standards*. Online verfügbar unter <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards>, zuletzt geprüft am 18.04.2014.

Codex Alimentarius Commission (o.J.b): *Codex Alimentarius: International Food Standards*. Online verfügbar unter <http://www.codexalimentarius.org>, zuletzt geprüft am 18.04.2014.

Codex Alimentarius Commission (1995): *Codex STAN 190. Codex general standard for quick frozen fish fillets*. Online verfügbar unter [www.codexalimentarius.org/download/standards/115/CXS\\_190e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/download/standards/115/CXS_190e.pdf), zuletzt geprüft am 17.04.2014.

Codex Alimentarius Commission (2004): *Codex STAN 244. Standard for salted Atlantic herring and salted sprat*. Online verfügbar unter [www.codexalimentarius.org/download/standards/10271/CXS\\_244e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/download/standards/10271/CXS_244e.pdf), zuletzt geprüft am 17.04.2014.

Eckert, J.; Friedhoff, K. T.; Zahner, H.; Deplazes, P. (2008): *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. 2. Aufl. Stuttgart: Enke.

Etzel, V.; Ramdohr, S. (2006): Bemerkungen zu Untersuchungsmethoden und Beurteilung von Nematodenlarven in Wildlachs. In: *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1 (2), S. 192.

Europäische Union (2004a): Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. In: *Amtsblatt der Europäischen Union*. Online verfügbar unter <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:DE:PDF>, zuletzt geprüft am 17.04.2014.

Europäische Union (2004b): Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs. In: *Amtsblatt der Europäischen Union*. Online verfügbar unter <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0206:0320:DE:PDF>, zuletzt geprüft am 17.04.2014.

Europäische Union (2005): Verordnung (EG) Nr. 2074/2005 der Kommission vom 5. Dezember 2005 zur Festlegung von Durchführungsvorschriften für bestimmte unter die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates fallende Erzeugnisse und für die in den Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vorgesehenen amtlichen Kontrollen, zur Abweichung von der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 853/2004 und (EG) Nr. 854/2004. In: *Amtsblatt der Europäischen Union*. Online verfügbar unter <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0027:0059:DE:PDF>, zuletzt geprüft am 17.04.2014.

Hiepe, T. (2006): Parasitismus als Lebensform - eine Einführung. In: T. Hiepe, R. Lucius und B. Gottstein (Hg.): *Allgemeine Parasitologie. mit den Grundzügen der Immunbiologie, Diagnostik und Bekämpfung*. 1. Aufl. Stuttgart: Parey, S. 1–23.

Huss, H. H.; Embarek, P. K. B. (2004): Parasites. In: H. H. Huss, L. Ababouch und L. Gram (Hg.): *Assessment and management of seafood safety and quality*. Rom: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO fisheries technical paper, 444), S. 60–69.

Karl, H. (2008): Nematode larvae in fish on the German market. 20 years of consumer related research. In: *Archiv für Lebensmittelhygiene* 59 (3), S. 107–116.

Karl, H.; Ostermeyer, U. (2012): *3. Nationaler Ringversuch zum Nachweis von NL mit der Durchleuchtungs- und der Digestionsmethode. Zusammenfassung der Ergebnisse*.

Kepplinger, M. (2008): *Wirkungen des Fernsehens in der Bundesrepublik*. In: Schwarz, H.-P. (Hg.) (2008): *Die Bundesrepublik Deutschland. Eine Bilanz nach 60 Jahren*. Köln: Böhlau, S. 333-352.

Krauss, H.; Weber, A.; Appel, M.; Enders, B.; Graevenitz, A. v.; Isenberg, H. D.; Schiefer, H. G.; Slenczka, W.; Zahner, H. (2004): *Zoonosen. Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten*. 3. Aufl.: Deutscher Ärzte-Verlag.

Max Rubner-Institut (o.J.a): *Nachweis von Nematoden durch Durchleuchtung*.

Max Rubner-Institut (o.J.b): *Nachweis von Nematodenlarven im Muskelfleisch durch Verdauung*.

Mehlhorn, H. (2001): *Grundriss der Zoologie. Stämme und Baupläne*. 2. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum.

Mehlhorn, H.; Piekarski, G. (2002): *Grundriß der Parasitenkunde. Parasiten des Menschen und der Nutztiere*. 6. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum.

- Priebe, K. (2007): *Parasiten des Fischfilets. Erscheinungsbild, Biologie, Lebensmittelsicherheit*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Sakanari, J. A.; McKerrow, J. H. (1989): Anisakiasis. In: *Clinical Microbiology Reviews* 2 (3), S. 278–284.
- Suh, K. N.; Keystone, J. S. (2008): Intestinal Roundworms. In: D. Schlossberg (Hg.): *Clinical infectious disease*. 1. Aufl. Cambridge, New York: Cambridge University Press, S. 1335–1342.
- Tenter, A. M.; Schnieder, T. (2006): Erreger von Parasitosen. Taxonomie, Systematik und allgemeine Merkmale. In: T. Schnieder (Hg.): *Veterinärmedizinische Parasitologie*. 6. Aufl. Stuttgart: Parey, S. 26–73.
- Verbraucherzentrale (o.J.): *ALS / ALTS – Sachverständigen-Arbeitskreise*. Online verfügbar unter <http://www.lebensmittelklarheit.de/cps/rde/xchg/lebensmittelklarheit/hs.xsl/6600.htm>, zuletzt geprüft am 18.04.2014.

## 10. Anhang

### 10.1 Zusammenfassung Ergebnisse SWB

Versuch	Fisch-medium	Anzahl der GefäÙe	Fischmenge Mittelwert	Fischmenge SD	Digestions-temperatur	Dauer	Rückstand Min.-Max.	Rückstand Mittelwert	Rückstand SD
Vorversuch I	Hering	n=5	100	0	37	8 h	2,6-7	4,62	1,74
Vorversuch II	Hering	n=5	137,8	47,93	37	14 h	5,4-97,9	42,4	47,93
Vorversuch III	Hering	n=6	100	0	37	8 h	0,8-27,8	7,82	9,99
Vorversuch IV 1.	Hering	n=5	100	0	37	14 h	7,5-27	15,66	7,21
Vorversuch IV 2.	Hering	n=5	100	0	37	14 h	4-14,3	10,26	4,34
Vorversuch V	Hering	n=10	100	0	37	14 h+30 Min.	0-2,7	0,48	0,85
Vorversuch VI	Kabeljau	n=10	100	0	37	14 h	2,5-14,3	8,22	4,31
Vorversuch VII	Kabeljau	n=10	100	0	37	14 h+30 Min.	0-1,5	0,37	0,61
Vorversuch VIII	Kabeljau	n=10	100	0	37	14 h+30 Min.	0-5,6	1,28	1,70
Test I	Kabeljau	n=8	100	0	34,5	14 h+30 Min.	0-10,8	4,09	4,14
Test II	Kabeljau	n=10	100	0	30	14 h+30 Min.	0,2-12,7	2,92	3,89
Test III	Kabeljau	n=10	100	0	30	14 h+30 Min.	0-3,4	1,85	2,31
Hauptversuch I	Forelle	n=10	101,05	12,97	37	14 h+30 Min.	0-5,4	1,98	2,11
Hauptversuch II	Forelle	n=14	100,36	18,13	30	14 h+30 Min.	0-1,5	0,19	0,48
Hauptversuch II	Lachs	n=10	85,95	4,21	30	14 h+30 Min.	0-0	0	0
Hauptversuch II	Lachs	n=10	88,54	2,13	30	14 h+30 Min.	0-6,4	1,42	1,88

				WFR Nematodenlarven		WFR ganz
Versuch	Zustand der NL	hinzugefügte NL pro Gefäß	insgesamt hinzugefügte NL	ganz	Bruchstücke	in Prozent (%)
Vorversuch I	lebend	2	10	7	2	70
Vorversuch II	lebend	-	-	-	-	-
Vorversuch III	lebend	2	12	12	-	100
Vorversuch IV 1.	lebend	2	10	12	1	120
Vorversuch IV 2.	lebend	2	10	9	-	90
Vorversuch V	lebend	2	20	17	1	85
Vorversuch VI	lebend	3x1, 7x2	17	13	1	76,47
Vorversuch VII	gefroren/tot	3	30	20	9	66,67
Vorversuch VIII	gefroren/tot	2	20	2	21	10
Test I	gefroren/tot	2	16	10	10	62,50
Test II	gefroren/tot	2	20	20	0	100
Test III	gefroren/tot	1	10	10	0	100
Hauptversuch I	gefroren/tot	2x1, 3x3, 5x5	36	3	18	8,33
Hauptversuch II	gefroren/tot	4x0, 3x7, 5x10, 2x10*	91	38	50	41,76
Hauptversuch II	gefroren/tot	10 in 2 Gefäßen	50	9	40	18
Hauptversuch II	gefroren/tot	5 in 2 Gefäßen	25	7	17	28

## 10.2 Zusammenfassung Ergebnisse Magnetrührer

Versuch	Fisch-medium	Anzahl der Gefäße	Fischmenge Mittelwert	Fischmenge SD	Mittlere Digestions-temperatur	Dauer	Rückstand Min.-Max.	Rückstand Mittelwert	Rückstand SD
Test I	Kabeljau	n=2	200	0	29	2 h	0,4-1,2	0,8	0,57
Test II	Kabeljau	n=8	200	0	30,45	2 h	0-10	2,3	3,64
Haupt-versuch I	Forelle	n=24	104,42	9,61	30,37	2 h	0-6,5	1,38	1,79
Haupt-versuch I	Lachs	n=10	180	0	28,31	2 h	0-3,4	1,23	1,59

Versuch	Zustand der NL	hinzugefügte NL pro Gefäß	insgesamt hinzugefügte NL	WFR Nematodenlarven		WFR ganz in Prozent (%)
				ganz	Bruchstücke	
Test I	gefroren/tot	2	4	4	0	100
Test II	gefroren/tot	2	16	16	0	100
Hauptversuch I	gefroren/tot	4x0, 2x1, 3x3, 5x5, 3x7, 5x10, 2x10*	127	114	9	89,76
Hauptversuch I	gefroren/tot	5x5, 5x10	75	58	5	77,34

## 10.3 Sicherheitsdatenblatt Pepsin



### 107190 Pepsin

(aus Magenschleimhaut vom Schwein) 2000 FIP-U/g EC 3.4.23.1, geeignet für die Verwendung als Excipient EMPROVE® exp

Wenn Sie allgemeine Fragen haben, wenden Sie sich bitte an unseren Kundenservice:

Merck KGaA  
Frankfurter Str. 250  
64293 Darmstadt  
Germany  
Telefon: +49 6151 72-0  
Fax: +49 6151 72 2000

17 März 2014


Bestellnummer	Verpackung	St./Pkg.	Preis
1071901000	Kst.-Flasche	1 kg	Preis auf Anfrage

Preisänderungen vorbehalten.


Produktinformationen	
HS-Warennummer	3507 90 90
EG-Nummer	232-629-3
Molare Masse	35000 g/mol
Lagerkategorie	Lagern unter +15°C.
EG-Indexnummer	647-008-00-6
CAS-Nummer	9001-75-6

Chemische und physikalische Daten	
Löslichkeit in Wasser	10 g/l (20 °C)
Molare Masse	35000 g/mol
Bulk density	380 - 420 kg/m <sup>3</sup>
pH-Wert	4.0 - 5.0 (10 g/l, H <sub>2</sub> O, 20 °C)

Sicherheitsinformationen gemäß GHS	
Gefahrenhinweis(e)	H315: Verursacht Hautreizungen. H319: Verursacht schwere Augenreizung. H334: Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden

	verursachen. H335: Kann die Atemwege reizen.
Sicherheitshinweis(e)	P302 + P352: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. P304 + P341: BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
Signalwort	Gefahr
Gefahren-Piktogramm	
Lagerklasse	10 - 13 Sonstige Flüssigkeiten und Feststoffe
WGK	WGK 1 schwach wassergefährdend

#### Sicherheitshinweise

R-Satz	R 36/37/38-42 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.Sensibilisierung durch Einatmen möglich.
S-Satz	S 22-24-26-36/37 Staub nicht einatmen.Berührung mit der Haut vermeiden.Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
Gefährlichkeitsmerkmal	reizend, sensibilisierend
Gefahrensymbol	 Harmful

#### Transportinformationen

Klassifizierung Schiene und Straße ADR, RID	Kein Gefahrgut
Klassifizierung Seeversand IMDG-Code	No Dangerous Good
Klassifizierung Luftversand IATA-DGR	No Dangerous Good



## 10.4 Sicherheitsdatenblatt Salzsäure



113386 Salzsäure rauchend 37%  
zur Analyse max. 0.001 ppm Hg EMSURE®

Wenn Sie allgemeine Fragen haben, wenden  
Sie sich bitte an unseren Kundenservice:

Merck KGaA  
Frankfurter Str. 250  
64293 Darmstadt  
Germany  
Telefon: +49 6151 72-0  
Fax: +49 6151 72 2000

17 März 2014

Bestellnummer	Verpackung	St./Pkg.	Preis
1133862500	Glasflasche	2.5l	Preis auf Anfrage

Preisänderungen vorbehalten.

### Zubehör

101595 Chemizorb® H<sup>+</sup> Absorptionsmittel und Neutralisationsmittel für verschüttete Säuren, mit Indikator

### Produktinformationen



Synonyme	Chlorwasserstoffsäure
HS-Warennummer	2806 10 00


### Chemische und physikalische Daten

Löslichkeit in Wasser	(20 °C) löslich
Schmelzpunkt	-28 °C
Dichte	1.19 g/cm <sup>3</sup> (20 °C)
pH-Wert	<math>< \times 0; - 1 (H_2O, 20 \text{ }^\circ\text{C})</math>
Siedepunkt	45 °C
Dampfdruck	190 hPa (20 °C)

### Sicherheitsinformationen gemäß GHS

Gefahrenhinweis(e)	H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. H335: Kann die Atemwege reizen.
--------------------	--

Sicherheitshinweis(e)	<p>P280: Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.</p> <p>P301 + P330 + P331: BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.</p> <p>P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.</p> <p>P309 + P310: BEI Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.</p>
Signalwort	Gefahr
Gefahren-Piktogramm	 
Lagerklasse	8B Nicht brennbare ätzende Gefahrstoffe
WGK	WGK 1 schwach wassergefährdend
Entsorgung	<p>12</p> <p>Anorganische Säuren und deren Anhydride werden gegebenenfalls zunächst verdünnt bzw. hydrolysiert, indem man sie vorsichtig in Eiswasser einrührt. Anschließend wird mit Natronlauge (Art. 105587) neutralisiert (Handschuhe, Abzug!). Vor Abfüllen in Kategorie D den pH-Wert mit pH-Universal-Indikatorstäbchen (Art. 109535) kontrollieren. Oleum wird unter gutem Rühren vorsichtig in 40prozentige Schwefelsäure (Art. 109286) eingetropt. Dabei immer ausreichende Mengen an Eis zur äußeren Kühlung bereithalten! Nach dem Abkühlen wird die entstandene hochkonzentrierte Schwefelsäure, wie vorstehend beschrieben, weiterbehandelt. Analog zu Oleum/Schwefelsäure können auch andere Anhydride in ihre entsprechende Säure getropft werden. Saure Gase (z.B. Halogenwasserstoff, Chlor, Phosgen, Schwefeldioxid) können in verdünnte Natronlauge eingeleitet und nach dem Neutralisieren in Kategorie D entsorgt werden.</p>

Sicherheitshinweise	
R-Satz	<p>R 34-37</p> <p>Verursacht Verätzungen.Reizt die Atmungsorgane.</p>
S-Satz	<p>S 26-36/37/39-45</p> <p>Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).</p>
Gefährlichkeitsmerkmal	ätzend
Gefahrensymbol	 <p>Corrosive</p>

Transportinformationen	
Klassifizierung Schiene und	UN 1789 Chlorwasserstoffsäure, 8, II

<b>Straße ADR, RID</b>	
<b>Klassifizierung Seeverbund IMDG-Code</b>	UN 1789 HYDROCHLORIC ACID, 8, II, Segregation Group: 1 (Acids)
<b>Klassifizierung Luftversand IATA-DGR</b>	UN 1789 HYDROCHLORIC ACID, 8, II


---

© Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, pls-customerservice(at)merck.de, 2014

## 10.5 Nachweis von Nematoden durch Durchleuchtung

### Max Rubner-Institut

Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Standort Hamburg

 MRI Max Rubner-Institut	Nachweis von Nematoden durch Durchleuchtung	Code: 2.3_S03
		Version 01
		Seite 1 von 4

#### Inhaltsverzeichnis:

1	Zweck und Anwendungsbereich .....	2
2	Begriff .....	2
3	Kurzbeschreibung .....	2
4	Chemikalien und Reagenzien .....	2
4.1	Sicherheitshinweise .....	2
5	Geräte .....	2
6	Probenahme .....	2
7	Durchführung der Bestimmung von Nematodenlarven mit der Durchleuchtung .....	2
8	Ergebnisfindung und Dokumentation .....	3
9	Mitgeltende Dokumente .....	3

Bearbeiter: Karl	Fachliche Prüfung	Normprüfung (QMB)	Freigabe (GL / KBL)
Datum:	Geprüft am:	Geprüft am:	Gültig ab:
gez.	gez.	gez.	gez.

## 1 Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zum Nachweis von Nematodenlarven in Fischfilets durch Durchleuchtung des Muskelfleisches. Mindestanforderungen an die Leuchtstärke der Tische in Codex STAN 190-1995

## 2 Begriff

Nematodenlarven sind Parasiten, die von Fischen über die Nahrung aufgenommen werden und partiell ins Muskelfleisch abwandern können. Der Verzehr von lebenden Nematodenlarven kann zu schweren Erkrankungen führen.

Bei Fischen aus dem Nordatlantik sind vor allem zwei Arten von Nematodenlarven zu finden: *Anisakis simplex* und *Pseudoterranova decipiens*.

## 3 Kurzbeschreibung

Die zu untersuchenden Fische werden filetiert, die Filets enthäutet, auf den eingeschalteten Leuchttisch gelegt und visuell untersucht.

## 4 Chemikalien und Reagenzien

entfallen

### 4.1 Sicherheitshinweise

Beim Filetieren und enthäuten sind geeignete Schutzmaßnahmen zu ergreifen (Schutzkleidung, Handschuhe) die Schnittverletzung verhindern.

## 5 Geräte

- o Leuchttisch nach Gerätebuch 2.3\_G01
- o Laborwaage nach Gerätebuch 2.3\_G03
- o Filetirmesser/ Schneidebretter

## 6 Probenahme

Die zu untersuchenden Proben werden auf Seereisen, auf Fischmärkten, und im Handel genommen oder von entsprechenden Interessenten angeliefert (s. SOP 2.3\_S04). Sie werden direkt eingesetzt oder bis zur Untersuchung im Kühlraum 2 tiefgefroren aufbewahrt. Für die Untersuchung wird das Untersuchungsmaterial entsprechend vorbereitet, je nach dem welcher Teil analysiert werden soll.

## 7 Durchführung der Bestimmung von Nematodenlarven mit der Durchleuchtung

Der Leuchttisch wird 5 min vor Beginn der Untersuchungen eingeschaltet und es wird visuell überprüft, ob alle Leuchtmittel funktionieren. Falls Unsicherheit besteht, ob die volle Lichtstärke erreicht wird, wird die Funktionstüchtigkeit gemäß Anweisung des Gerätebuchs Leuchttische (2.3\_G01) überprüft.

Die Fische werden auf der Waage gewogen, ggf. aufgetaut, filetiert, die Filets wiederum gewogen und einzeln auf den Leuchttisch gelegt. Jedes Filet wird visuell auf sichtbare Nematodenlarven untersucht. Dazu wird das Filet von beiden Seiten durchleuchtet. Die Zahl der sichtbaren Nematodenlarven wird auf dem Formblatt notiert. Ggf. wird die Anzahl der Nematodenlarven getrennt nach Bauchlappen und Filet bestimmt.

**8 Ergebnisfindung und Dokumentation**

Die Anzahl der Nematodenlarven wird in einem Formblatt eingetragen und in die entsprechende Datei übernommen. Hierzu siehe Beispielformblatt für Nematodenuntersuchungen (2.3\_A20 Nematodenformblatt). Das Formblatt ist den jeweiligen Untersuchungszielen anzupassen.

Halbe Nematodenlarven sind extra zu notieren.

**9 Mitgeltende Dokumente**

- o Gerätebuch 2.3\_G01 Leuchttische
- o Gerätebuch 2.3\_G03 Waagen
- o SGP 2.3\_S04 Probenbehandlung im NRL Labor 2.3
- o 2.3\_A20 Nematodenformblatt
- o Codex STAN 190-1995


<b>MRI</b> Max-Planck-Institut Hamburg	<b>Verteilerliste</b>	2.3_S03
Dokumenttitel:	Nachweis von Nematoden durch Durchleuchtung	

Version des Dokuments:	
Dokument gültig ab:	

Verteiler (Details siehe 1.1_S02)	Orig./ Kop.	Empfänger/in	Expl.	Datum, Unterschrift
<b>Zentrale Verteiler</b>				
Oberste Leitung (Dokumente der Ebene 1.1)	K	Institutsleitung MF	1	
Qualitätsmanagement	K		1	
Archiv	O		1	
<b>Weitere Verteiler</b>				
KB 2.1 (nur 2.1_... - Dokumente)	K			
KB 2.1.1	K			
KB 2.1.1 (Schädtbek)	K			
KB 2.1.2	K			
KB 2.1.3	K			
KB 2.1.4	K			
KB 2.1.5	K			
KB 2.1.6	K			
KB 2.2 (nur 2.2_... - Dokumente)				
KB 2.2.2	K			
KB 2.2.3	K			
KB 2.3	K			



## 10.6 Nachweis von Nematodenlarven im Muskelfleisch durch Verdauung

<b>Max Rubner-Institut</b> Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Standort Hamburg			
<b>MRI</b> Max Rubner-Institut		Nachweis von Nematodenlarven im Muskelfleisch durch Verdauung	Code: 2.3_S02
			Version 02
			Seite 1 von 4

### 1.1 Veränderungen / Unterschiede zur Vorgängerversion des Dokuments

2.3\_S02 Durchführung Pkt 8 geändert von 11 Pepsinlg auf 1,8 l Pepsinlg.

#### Inhaltsverzeichnis:

1.1	Veränderungen / Unterschiede zur Vorgängerversion des Dokuments.....	1
2	Zweck und Anwendungsbereich .....	2
3	Begriff.....	2
4	Kurzbeschreibung .....	2
5	Chemikalien und Reagenzien.....	2
5.1	Ansatz der Verdauungslösung.....	2
5.2	Sicherheitshinweise.....	2
6	Geräte .....	2
7	Probenahme.....	3
8	Durchführung der Bestimmung von Nematodenlarven mit der Verdauung .....	3
9	Ergebnisfindung und Dokumentation.....	3
10	Mitgeltende Dokumente .....	3

Bearbeiter: Karl	Fachliche Prüfung	Normprüfung (QMB)	Freigabe (OL / KBL)
Datum:	Geprüft am:	Geprüft am:	Gültig ab:
gez.	gez.	gez.	gez.



## 2 Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Nematodenlarven (NL) in Fischen durch Verdauung des Muskelfleisches bzw. der Eingeweide.

## 3 Begriff

Nematodenlarven sind Parasiten, die von Fischen über die Nahrung aufgenommen werden und partiell ins Muskelfleisch abwandern können.

Der Verzehr von lebenden Nematodenlarven kann zu schweren Erkrankungen führen. Bei Fischen aus dem Nordatlantik sind vor allem zwei Arten von Nematodenlarven zu finden: *Anisakis simplex* und *Pseudoterranova decipiens*.

## 4 Kurzbeschreibung

Das zu untersuchende Muskelfleisch wird mit der Hand zerkleinert, es wird eine ausreichende Menge an Pepsin-Verdauungslösung zugegeben und das Fleisch bei 35 °C unter Rühren vollständig aufgelöst. Die Nematodenlarven verbleiben unbeschädigt im Rückstand, werden über ein Sieb abgetrennt und auf einer dunklen Unterlage ausgezählt. Der Nachweis erfolgt gemäß Codex Standard 244-2004 Annex I.

## 5 Chemikalien und Reagenzien

- o Pepsin 2000 FIP-U/g EC 3.4.23.1 z.B. Merck Nr. 1.07190.1000
- o 37 %ige Salzsäure rauchend z.B. Merck Nr. 1.13386.2500

### 5.1 Ansatz der Verdauungslösung

0,5 % (w/v) Pepsin in 0,063 M Salzsäure

In einen 10 l PE-Kanister werden ca. 4l warmes Leitungswasser (ca. 30 °C) gegeben.

54 ml 37 %ige HCL hinzugefügt, der Kanister wird durchgeschüttelt und weitere 2l Wasser hinzugegeben. 50 g Pepsin werden in einem 100 ml Becherglas auf der Laborwaage (auf +/- 0,1 g genau abgewogen. Es wird über einen Pulvertrichter vorsichtig in den Kanister gegeben. Das Becherglas wird mit 80 ml Wasser gespült und die Lösung ebenfalls in den Kanister gegeben. Der Kanister wird verschlossen und kräftig durchgeschüttelt. Nach Absetzen des Schaumes wird mit warmen Leitungswasser auf bis zur Marke 10l aufgefüllt und nach dem Verschließen nochmals geschüttelt.

### 5.2 Sicherheitshinweise

Beim Arbeiten mit konzentrierter Salzsäure ist Schutzkleidung zu tragen und es sind die Arbeitsschutzmaßnahmen des Sicherheitsdatenblattes zu befolgen. Beim Umgang mit Pepsin sind der Kontakt mit dem Pulver und das Einatmen von Stäuben zu vermeiden. Die Angaben des Sicherheitsdatenblattes sind zu beachten.

## 6 Geräte

Zusätzlich zur Standardausstattung eines analytisch-chemischen Labors werden benötigt:

- Magnetrührer mit Heizung und Kontaktthermometer nach Gerätebuch 2.3 G04 (Magnetrührplatten)
- Sieb (Maschenweite 0,5 mm) nach Gerätebuch 2.3 G05 (Siebe)
- Mischzylinder 100 ml +/- 2 ml
- Große Petrischale
- Schwarze Unterlage

- 2l Becherglas
- Magnetrührstäbchen
- Pinzetten
- Laborwaage nach Gerätebuch 2.3. G03

## 7 Probenahme

Die zu untersuchenden Proben werden auf Seereisen, auf Fischmärkten, und im Handel genommen oder von entsprechenden Interessenten angeliefert (s. SOP 2.3\_S04). Sie werden direkt eingesetzt oder bis zur Untersuchung im Kühlraum 2 tiefgefroren aufbewahrt. Für die Untersuchung wird das Untersuchungsmaterial entsprechend vorbereitet, je nachdem welcher Teil analysiert werden soll.

## 8 Durchführung der Bestimmung von Nematodenlarven mit der Verdauung

200 g mit der Hand zerkleinertes Fischfleisch wird in ein 2l Becherglas überführt und 1,8 l Pepsinlösung hinzu gegeben. Die Mischung wird auf einem Magnetrührer mit Kontaktthermometer nach Zugabe eines Magnetrührstäbchens unter langsamem Rühren auf 35 °C erhitzt und für 1 - 2 h gerührt. Falls das Fleisch nicht vollständig aufgelöst ist, wird über ein feines Sieb abfiltriert, der Rückstand mit Leitungswasser gespült und wieder quantitativ in das Becherglas gegeben. Es wird 700 ml Pepsinlösung zugefügt und so lange unter Erhitzen auf 35 °C gerührt bis alles Fischfleisch verdaut ist (meist reichen 10 min aus). Die verdaute Lösung wird über ein Sieb dekantiert, das Becherglas mit Leitungswasser nachgespült und der Inhalt wieder über das Sieb abgegossen. Der Siebinhalt wird mit Leitungswasser gespült und der verbleibende Rückstand ggf. mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig in schwarze Kunststoffschalen überführt, die etwas Pepsin/HCL-Lsg. enthalten. Die Nematodenlarven werden ausgezählt. Zur Überprüfung, ob noch lebende NL vorhanden sind, werden die Nematodenlarven in eine Petrischale überführt, die etwas Pepsin/HCL- Lsg. enthält. Die Schale wird auf einen Leuchttisch gestellt und durch die Strahlungswärme erhitzt. Lebende Nematodenlarven zeigen unter diesen Bedingungen deutliche Eigenbewegungen. Es ist darauf zu achten, dass die Petrischale nicht über 37 °C erhitzt wird.

## 9 Ergebnisfindung und Dokumentation

Die Anzahl der Nematodenlarven wird in einem Formblatt eingetragen (2.3\_A20 „Nematodenformblatt“) und in die entsprechende Datei übernommen. Das Formblatt ist den jeweiligen Untersuchungszielen anzupassen. Halbe Nematodenlarven sind extra zu notieren.

## 10 Mitgeltende Dokumente

- o Gerätebuch 2.3 G04 (Magnetrührplatten)
- o Gerätebuch 2.3 G05 (Siebe)
- o SOP 2.3\_S04
- o Kontrollblatt 2.3\_A10 „Nematodenformblatt“

<b>MRI</b> Max Rubner-Institut Hamburg	<b>Verteilerliste</b>	2.3_S02
Dokumenttitel: Nachweis von Nematodenlarven im Muskelfleisch durch Verdauung		

Version des Dokuments:	
Dokument gültig ab:	

Verteiler (Details siehe 1.1_S02)	Orig./ Kop.	Empfänger/in	Expl.	Datum, Unterschrift
<b>Zentrale Verteiler</b>				
Oberste Leitung (Dokumente der Ebene 1.1)	K	Institutsleitung MF	1	
Qualitätsmanagement	K		1	
Archiv	O		1	
<b>Weitere Verteiler</b>				
KB 2.1 (nur 2.1_... - Dokumente)	K			
KB 2.1.1	K			
KB 2.1.1 (Schädttbek)	K			
KB 2.1.2	K			
KB 2.1.3	K			
KB 2.1.4	K			
KB 2.1.5	K			
KB 2.1.6	K			
KB 2.2 (nur 2.2_... - Dokumente)				
KB 2.2.2	K			
KB 2.2.3	K			
KB 2.3	K			

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Diese Arbeit hat in dieser oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Die eingereichte Fassung entspricht der auf dem Medium gespeicherten Fassung.

Hamburg, im Mai 2014

---

(Binia Gedai)