

Aus dem Department für Nutztiere und Öffentliches Gesundheitswesen  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und  
Öffentliches Gesundheitswesen  
(Leiter:in: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Martin Wagner, Dipl.ECVPH)

# Stressindikatoren im Bereich der Hälterung und Schlachtung von Speisefischen

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von  
Anna Rottinger, BSc

Wien, im Juni 2023

Betreuerin: Dr.med.vet. Gabriele Flekna

1. Gutachterin: Dr.med.vet. Gabriele Flekna

2. Gutachterin: Priv.-Doz. Dr.med.vet. Dipl.ECAAH Eva Lewisch

## **Danksagung**

Am Ende meiner Studienzeit möchte ich nun meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden von ganzem Herzen danken. Ihre bedingungslose Unterstützung, der Zuspruch und die Liebe, die mir entgegengebracht wurde, hat mir geholfen, meine Ziele zu erreichen. Sie waren und sind meine Stütze in schwierigen Zeiten und haben mich gefeiert, wenn ich erfolgreich war. Ohne diese besonderen Menschen an meiner Seite wäre diese Reise nicht dieselbe gewesen. Von meiner Familie habe ich zu jeder Zeit Rückhalt bekommen, mein Freund war mein Fels in der Brandung und meine Freunde haben mir den nötigen Ausgleich geboten. Ihre Liebe und Unterstützung sind unbezahlbar und ich bin unendlich dankbar, alle in meinem Leben zu haben. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt und mich auf meinem Weg begleitet habt.

## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, Anna Rottinger, dass beim Erstellen dieser Arbeit:

- keine anderen als die erwähnten Hilfsmittel und Literaturstellen einbezogen wurden,
- die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt wurden,
- die zur Beurteilung vorgelegte Diplomarbeit eigenständig verfasst wurde, sowie
- die Arbeit nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht wurde.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Anna Rottinger', written in a cursive style.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Allgemeine Stressantwort .....	2
1.2 Gesetzliche Regelungen für die Tötung von Tieren .....	4
<b>2. Material und Methoden</b> .....	7
<b>3. Ergebnisse</b> .....	10
3.1 Hälterung .....	10
3.2 Schlachtung.....	16
3.2.1 Betäubungsverfahren.....	16
3.3 Zusammenfassung und Gegenüberstellung Stressor/ -en und gemessene Stressparameter .....	22
<b>4. Diskussion</b> .....	26
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	32
<b>6. Summary</b> .....	33
Literaturverzeichnis .....	34
Abbildungsverzeichnis .....	38
Tabellenverzeichnis .....	39

## 1. Einleitung

Das Wohlergehen der Tiere ist den Menschen schon immer ein Anliegen. Es wird auch viel Wert daraufgelegt, wie vor allem Tiere zur Lebensmittelgewinnung, gehalten und geschlachtet werden. In den letzten Jahren fordern unter anderem die Konsument:innen einen tierschutzgerechteren Umgang mit Fischen. Speisefische liefern eine reichhaltige Proteinquelle und durch den Beweis, dass Fische Emotionen empfinden können, welche sich auf das Tierwohl auswirken, ist ein stressfreier Fleischgewinnungsprozess heute unabdingbar.

Um diesen tierschutzgerechten Umgang beurteilen zu können, wurden in den letzten Jahren viele Untersuchungen angestrebt. Eine verlässliche Beurteilung des Tierwohls stützt sich auf tierbezogene Indikatoren. Tierschutzgestützte Indikatoren beziehen sich auf die Verwendung von Messgrößen, um die Haltungsbedingungen von Fischen in Aquakulturen, zu bewerten. Diese Indikatoren können speziell in der Hälterung und Schlachtung verwendet werden, um Stress und tierschutzrelevante Belastungen zu erkennen und künftig zu vermeiden.

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit den biochemischen Grundlagen von Stress und ob bzw. inwiefern dieselben Indikatoren bei der Hälterung und Schlachtung Anwendung finden. Hierfür erweist es sich als nützlich die Stressantwort der Fische überblicksmäßig darzulegen. Des Weiteren sollen auch die derzeit gültigen gesetzlichen Vorgaben und die darin verwendeten Parameter zum Schutz der Tiere vor Stress, Schmerzen und Leiden kurz erwähnt werden. Es wird davon ausgegangen, dass Kurzzeitstress (Tötung) und Langzeitstress (Hälterung) denselben homöostatischen Regelprinzipien unterliegen und somit dieselben Stressindikatoren angewendet werden können.

Die Hypothese wird anhand der vorangegangenen Stressstudien aufgestellt, da die Mehrheit der Forscher:innen für unterschiedliche Stresssituationen, obgleich akut oder chronisch, dieselben Messungen der im Blut zirkulierenden Stresshormone vornahm. Da die Stressantwort der Fische weitestgehend untersucht ist und man die verschiedenen Ebenen davon kennt, wird nun auch angenommen, dass dadurch die verwendeten Stressparameter auf allen Ebenen gleich anzuwenden sind. Am Ende dieses Kapitels befindet sich die genaue Ausführung dazu.

## 1.1 Allgemeine Stressantwort

Stress wird ausgelöst durch herausfordernde und belastende Situationen. Dabei gerät der homöostatische Zustand eines Lebewesens aus den Fugen und wird durch verschiedenste adaptierende Reaktionen versucht wieder ins Gleichgewicht zu bringen (Barton, 2002). Diese Antworten auf eine Stresssituation sind abhängig vom Lebewesen und dem jeweiligen Stressor und werden unterschiedlich eingeteilt.

Bei Fischen unterscheidet man die primäre, sekundäre und tertiäre Stressantwort. Zu den primären Reaktionen gehören endokrine Veränderungen, wie messbare zirkulierende Katecholamine und Kortikosteroide (Wendelaar Bonga, 1997). Sekundäre Reaktionen sind wiederum Veränderungen des Stoffwechsels, des Mineralhaushalts, des Herz-Kreislauf-Systems oder der Atmung (Barton, 2002). Häufig sind primäre endokrine Veränderungen für sekundäre Reaktionen verantwortlich. Aus den primären und sekundären Stressantworten können sich tertiäre Veränderungen in Bezug auf die Leistung der Tiere, wie z.B. Wachstumseinbußen, geschwächte Immunantwort, gestörte Reproduktion oder verminderte Überlebensfähigkeit, ergeben (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 1997).

Bei einem direkt wahrgenommenen Stressor wird die physiologische Stressreaktion durch das zentrale Nervensystem ausgelöst. Die sympathischen Nervenfasern, welche die chromaffinen Zellen innervieren, stimulieren über cholinerge Rezeptoren die Freisetzung von Katecholaminen (Barton, 2002). Das chromaffine Gewebe (ein Homolog des Nebennierenmarks der Säugetiere) befindet sich bei Fischen hauptsächlich im vorderen Bereich der Nieren.

Die Katecholamine, vor allem Adrenalin und Noradrenalin, werden rasch in das Blut freigesetzt und somit erhöht sich der Blutplasmaspiegel dieser Hormone sofort bei Stress. Weiters aktivieren sie verschiedene Rezeptoren im Körper, die für die Freisetzung von Glukose aus den Glykogenspeichern der Leber verantwortlich sind. Dadurch wird Energie für den Flucht- oder Kampfmodus bereitgestellt (Barton, 2002).

Hingegen die Freisetzung von Cortisol ist etwas verzögert. Diese beginnt bei der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN) mit der Freisetzung von

Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) bzw. Corticotropin-Faktor aus dem Hypothalamus, der die kortikotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens zur Sekretion von Adrenocorticotropin (ACTH) anregt (Wendelaar Bonga, 1997). Das zirkulierende ACTH wiederum stimuliert die in der Niere eingebetteten Nebennierenzellen zur Synthese und Freisetzung von Kortikosteroiden in den Blutkreislauf (Barton, 2002). Cortisol ist das wichtigste Kortikosteroid. Es fördert die Mobilisierung von Energie durch die Freisetzung von Glukose in das Blut und beeinflusst den Stoffwechsel von Proteinen und Fetten. Außerdem kann es das Immunsystem unterdrücken (Barton, 2002).

Neben der Aktivierung der HHN-Achse kann Stress bei Fischen auch eine oxidative Belastung im Körper verursachen. Der oxidative Stress entsteht durch die Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Zellen und Gewebe schädigen können. Diese ROS findet man bei Fischen in der Leber, im Gehirn und in den Muskeln und können insbesondere nach einem chronischen Stressor erhöht sein (Barton, 2002).

Ein weiterer biochemischer Effekt von Stress bei Fischen ist eine Veränderung der Hitzeschockproteine (HSP). HSP dienen dazu, den Zellstress abzubauen und die Proteinfaltung im Körper aufrecht zu erhalten. Vor allem bei Langzeitstress kann jedoch eine Überexpression von HSP auftreten, die den Energiebedarf der Fische erhöht und zu einer Veränderung der Proteinzusammensetzung führen kann (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 1997).

Als häufigster Stressindikator bei Fischen wurde der Anstieg des Cortisollevels im Blut verwendet. Durch die verzögerte Ausschüttung lässt sich ein Ruhewert bzw. Nullwert bestimmen, von dem aus auf die Erhöhung der Plasmaspiegel nach einem akuten Stressor geschlossen werden kann (Barton, 2002). Dies kann man typischerweise bereits nach einigen Minuten messen und der Cortisolwert kehrt normalerweise nach einer bis mehreren Stunden auf den Ruhewert zurück (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 1997)

Handelt es sich um chronischen Stress, kann es vorkommen, dass Plasmacortisolspiegel und Katecholaminwerte im Blut über Stunden oder Tage erhöht bleiben (Barton, 2002).

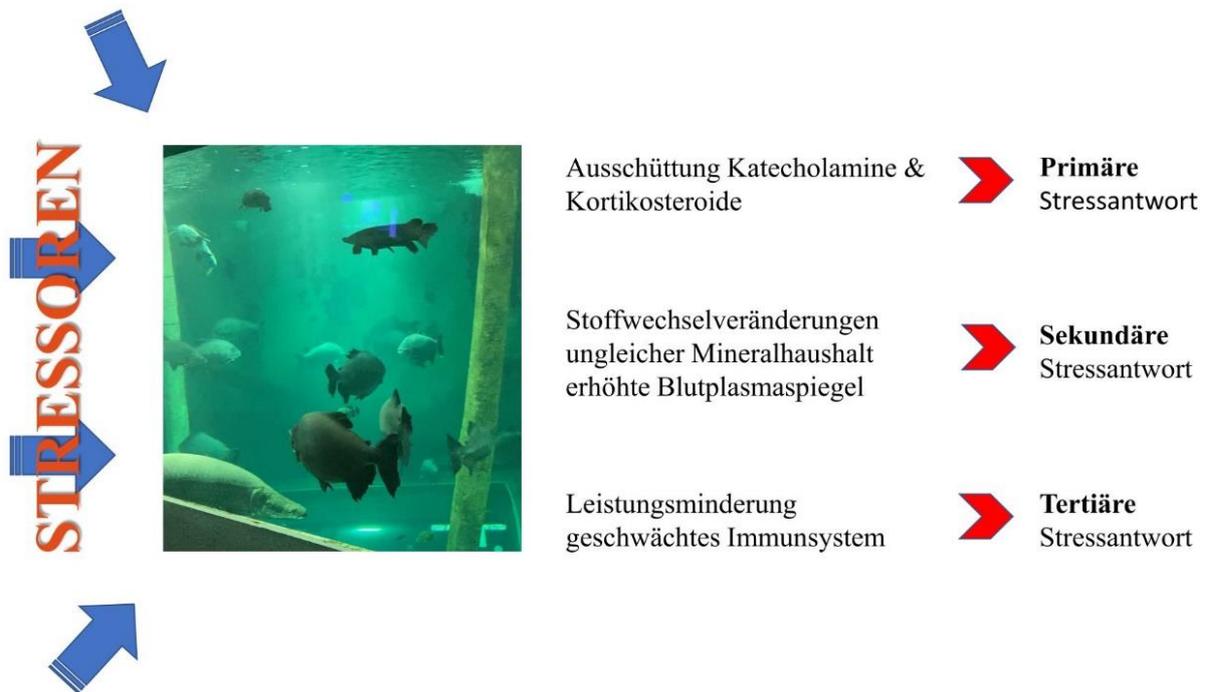


Abbildung 1: Übersicht der Ebenen der Stressantwort beim Fisch.

## 1.2 Gesetzliche Regelungen für die Tötung von Tieren

Um einen tierschutzgerechten Umgang speziell auch für Lebensmittelliefernde Tiere zu gewährleisten wurde 2009 von der Europäischen Union eine Verordnung über den Schutz von Tieren zum Zeitpunkt der Tötung erlassen (EG 1099/2009). Jedoch findet sich in diesem Gesetz keine spezifische Regelung für Fische, welche zum Zweck der Lebensmittelerzeugung geschlachtet werden. Es wird vom Rat der Europäischen Union in Artikel 27 darauf verwiesen, fehlende Aspekte in der nationalen Umsetzung der Verordnung zu berücksichtigen. Österreich hat dieser Empfehlung Rechnung getragen und die Verordnung über den Schutz von Tieren bei der Schlachtung oder Tötung mit dem Anhang B „Vorschriften über das Aufbewahren und Töten von Speisefischen, Fröschen, Krusten- und Schalentieren“ (Tierschutz-Schlachtverordnung) ergänzt.

In den Abb. 2 und 3 sind die darin bestimmten Angaben ersichtlich. Vor allem die sich darin befindlichen Tabellen, sind als relevant für diese Arbeit zu verstehen.

### VORSCHRIFTEN ÜBER DAS AUFBEWAHREN UND TÖTEN VON SPEISEFISCHEN, FRÖSCHEN, KRUSTEN- UND SCHALENTIEREN

1. Lebende Speisefische dürfen nur in Behältern aufbewahrt werden, deren Wasservolumen den Tieren ausreichende Bewegungsmöglichkeiten bietet. Unverträgliche Fische müssen voneinander getrennt gehalten werden. Den Wasserqualitäts-, Temperatur- und Lichtansprüchen der einzelnen Arten ist Rechnung zu tragen. Insbesondere müssen ein ausreichender Wasseraustausch und eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Tiere sichergestellt sein. Die Werte folgender Tabelle sind bei der Hälterung von Speisefischen zu berücksichtigen:

	Forellen	Karpfen	Aale	Welse	Hechte
Temperatur	5-11°C	10-15°C	10-15°C	10-15°C	10-15°C
pH-Wert	6,5-8	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5
min. O <sub>2</sub> -Gehalt am Ablauf	6-7 mg/l	5 mg/l	5 mg/l	5 mg/l	5 mg/l
Hälterungsdauer	10 Tage	4 Wochen	4 Wochen	4 Wochen	10 Tage
max. Besatzdichten kg/1000 l	50 kg	200 kg	200 kg	100 kg	50 kg
besondere Schutzvorkehrungen	-	-	Zu- und Ablauf sichern	abdunkeln	-

2. Das Allgemeinbefinden und der Gesundheitszustand der Tiere sind vom Betreuungspersonal jeden Morgen und jeden Abend zu kontrollieren. Tote Tiere sind unverzüglich aus dem Behälter zu entfernen.
3. Wer einen Fisch schlachtet oder tötet, muss diesen unmittelbar vor dem Schlachten oder Töten betäuben. Ohne vorherige Betäubung dürfen
- Plattfische durch einen schnellen Schnitt, der die Kehle und die Wirbelsäule durchtrennt und
  - Aale, wenn sie nicht gewerbsmäßig gefangen werden, durch einen die Wirbelsäule durchtrennenden Stich dicht hinter dem Kopf und sofortiges Herausnehmen der Eingeweide einschließlich des Herzens geschlachtet oder getötet werden.

Abbildung 2: Tierschutz-Schlachtverordnung Anhang B Teil 1.

4. Bei der Elektrobetäubung von Aalen ist Trinkwasser mit einer elektrischen Leitfähigkeit von unter 1000 Mikrosiemens pro Zentimeter ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) zu verwenden. Vor Beginn der Betäubung ist die elektrische Leitfähigkeit des Wassers in der Betäubungsanlage zu messen und die zur Betäubung erforderliche Stromdichte einzustellen. Hierzu ist die angelegte Spannung so einzustellen, dass zwischen den Elektroden ein Wechselstrom in Ampère (A) pro Quadratdezimeter ( $\text{dm}^2$ ) stromzuführender Elektrodenfläche fließt, welcher der in der folgenden Tabelle für die gemessene elektrische Leitfähigkeit angegebenen Stromdichte entspricht:

Elektrische Leitfähigkeit des Wassers (Mikrosiemens pro Zentimeter $-\mu\text{S}/\text{cm}-$ )	Stromdichte (Ampère je Quadratdezimeter $-\text{A}/\text{dm}^2 -$ )
bis 250	0,10
über 250 bis 500	0,13
über 500 bis 750	0,16
über 750 bis 1000	0,19

5. Der Betäubungsstrom muss mindestens fünf Minuten lang fließen. Unmittelbar nach Beendigung der Durchströmung sind die Aale zu entschleimen und zu schlachten.
6. Betreffend Betäubung anderer Fischarten sind die aktuellen Empfehlungen des OIE heranzuziehen.
7. Frösche sind durch rasches und vollständiges Abtrennen des Kopfes zu töten.
8. Krusten- und Schalentiere, außer Austern, dürfen nicht auf Eis aufbewahrt und nur in stark siedendem Wasser getötet werden. Das Wasser muss sie vollständig bedecken und nach ihrer Zugabe weitersieden. Abweichend davon dürfen Schalentiere in über 100 Grad Celsius heißem Dampf getötet werden. Krustentiere sind vor dem Töten zu betäuben.

Abbildung 3: Tierschutz-Schlachtverordnung Anhang B Teil 2.

Die Verordnung EG 1099/2009 und die Tierschutz-Schlachtverordnung besagen, dass Tiere zum Zeitpunkt der Tötung von jedem vermeidbarem Schmerz, Stress und Leiden verschont bleiben sollen. Mit verschiedenen Parametern versucht der Mensch hier das Wohlbefinden von Tieren zu definieren. Im Fall der Speisefische wurden vor allem in den letzten zwei Jahrzehnten eine Vielzahl an Studien durchgeführt, welche diverse Indikatoren zur Messung von Stress untersuchten. Mit diesen Stressindikatoren wird versucht Rückschlüsse auf das Tierwohl zu ziehen.

In dieser Arbeit wird nun überprüft welche Stressparameter in der Aquakultur bei der Hälterung und Schlachtung verwendet werden und ob diese relevante Ergebnisse liefern. Zusätzlich gibt sie einen Ausblick auf vielversprechende zukünftige Forschungsgebiete, um den tierschutzgerechten Umgang und das Tierwohl bei der Tötung von Speisefischen zu verbessern.

Ziel dieser Diplomarbeit ist es, die derzeit vorliegenden Publikationen zur Stressforschung zu erfassen und zu evaluieren, ob dieselben Stressparameter bei Hälterung und Schlachtung Anwendung finden. Da davon ausgegangen wird, dass dieselben biochemischen Grundlagen der Stressantwort bei Kurzzeit- und Langzeitstress vorliegen.

Die Hypothese lautet somit, dass davon ausgegangen wird, dass Kurzzeitstress (Tötung) und Langzeitstress (Hälterung) denselben homöostatischen Regelprinzipien unterliegen und somit dieselben Stressindikatoren angewendet werden können

## 2. Material und Methoden

Bei der vorgelegten Diplomarbeit handelt es sich um eine Literaturliteraturarbeit, in welcher eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten zu Stressindikatoren beim Fisch ermittelt und erfasst wurden.

Speziell wurde das Augenmerk auf Stressstudien zu Speisefischen gelegt und im genaueren die Arbeiten zu Kurzzeit- und Langzeitstress vor allem bei Hälterung und Schlachtung evaluiert. Zur Beschaffung der Literatur, welche hierfür verwendet wurde, wurde mit unterschiedlichen Suchmaschinen und wissenschaftlichen Plattformen gearbeitet. Die online Suchmaschinen Pubmed und Google Scholar lieferten hier den Großteil der Arbeiten. Einige wissenschaftliche Arbeiten stammen direkt von der Plattform Researchgate. Außerdem wurde mit Hilfe der Suchmaschinen explizit nach Literatur aus den letzten 15 Jahren gesucht und nach frei zugänglichen Volltextpublikationen für Studierende der Vetmeduni (Shibboleth Account) gefiltert. Inkludiert wurden unter anderem die grundlegenden Stressarbeiten von z.B. Wendelaar Bonga (1997) und Barton (2002), sowie auch Übersichtsarbeiten zum Tierwohl in der Fischzucht, wie z.B. Huntingford et al. (2006) und Hastein et al. (2005).

Im Rahmen der Literaturrecherche wurden verschiedene Kombinationen diverser Suchbegriffe angewandt. Es wurde ausschließlich auf Englisch gesucht und die Begriffe „stress“, „distress“, „fish“, „slaughter“ und „harvesting“ kombiniert. Weiters wurde das Suchfeld durch zusätzliche Suchbegriffe, wie „review“, „indicator“, „stressor“ oder spezifischen Fischarten, wie „trout“, „carp“ und „catfish“, eingeeengt. In der Abb. 4 ist ersichtlich, wie die Suche auf Pubmed abgehalten wurde. Zuerst wurde allgemein gesucht und dann mit Hilfe von konkreten Wörtern zum Thema Stress oder Tötungsprozess eine Reduktion der Vielzahl an Literatur vorgenommen. Nach der Vorauswahl anhand von Titel und Abstract folgte ein Ausschluss von Duplikaten und zur finalen Eingrenzung wurde eine Volltextanalyse durchgeführt.

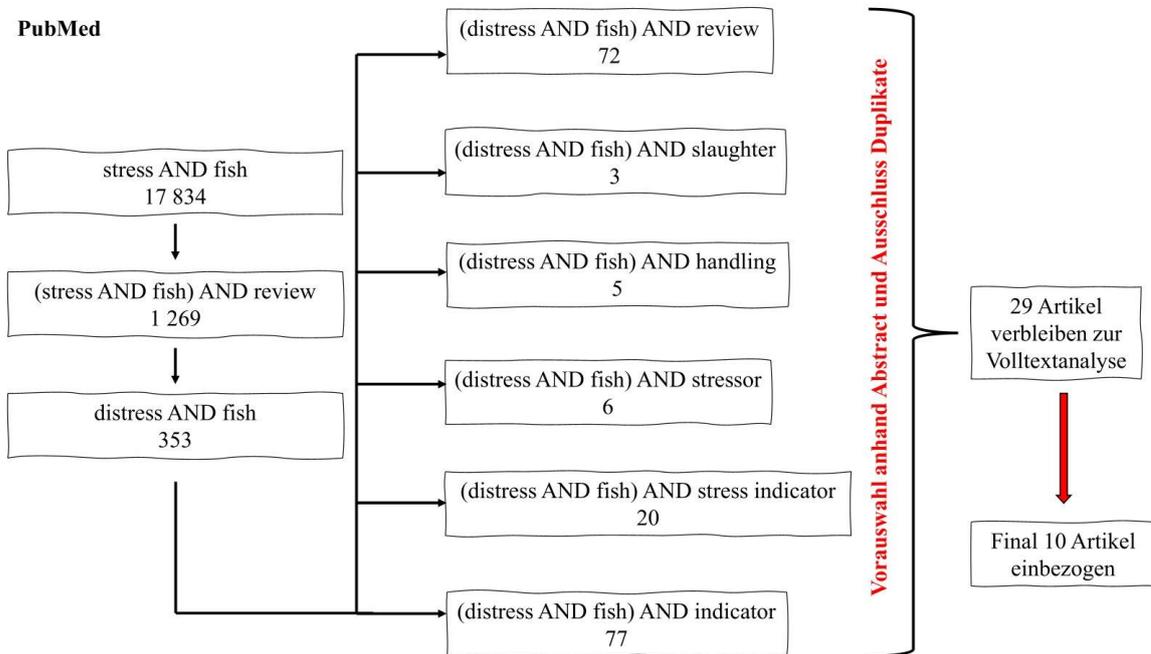


Abbildung 4: Graphische Darstellung des Auswahlverfahrens zur gefundenen Literatur auf Pubmed.

Ein ähnliches Vorgehen war es bei der Suche auf Google Scholar, wohingegen die Suche auf Google Scholar weitaus mehr Ergebnisse generierte. Die Zahlen und der Auswahlprozess dazu sind in der Abb. 5 einzusehen.

Weiters wurden einige wenige Publikationen bei Researchgate gefunden und zusätzlich wurden bereits persönlich vorhandene Abschriften auch in die Arbeit einbezogen.

Der Hauptteil der verwendeten Informationen stammt aus wissenschaftlichen Studien. Des Weiteren wurden Gesetztestexte und diverse Artikel und Beiträge, aus den öffentlichen Medien, verwendet. Es wurde der Großteil der wissenschaftlichen Literatur aus dem Internet bezogen. Die aktuell geltenden gesetzlichen Vorschriften wurden der Einfachheit halber ebenfalls elektronisch beschaffen. Jede verwendete Literaturquelle wurde anhand von vorher festgelegten Kriterien ausgewählt und bewertet. Wichtig war hier, wie oben bereits erwähnt, das Erscheinungsdatum und die Nachvollziehbarkeit und Qualität der Quellen.

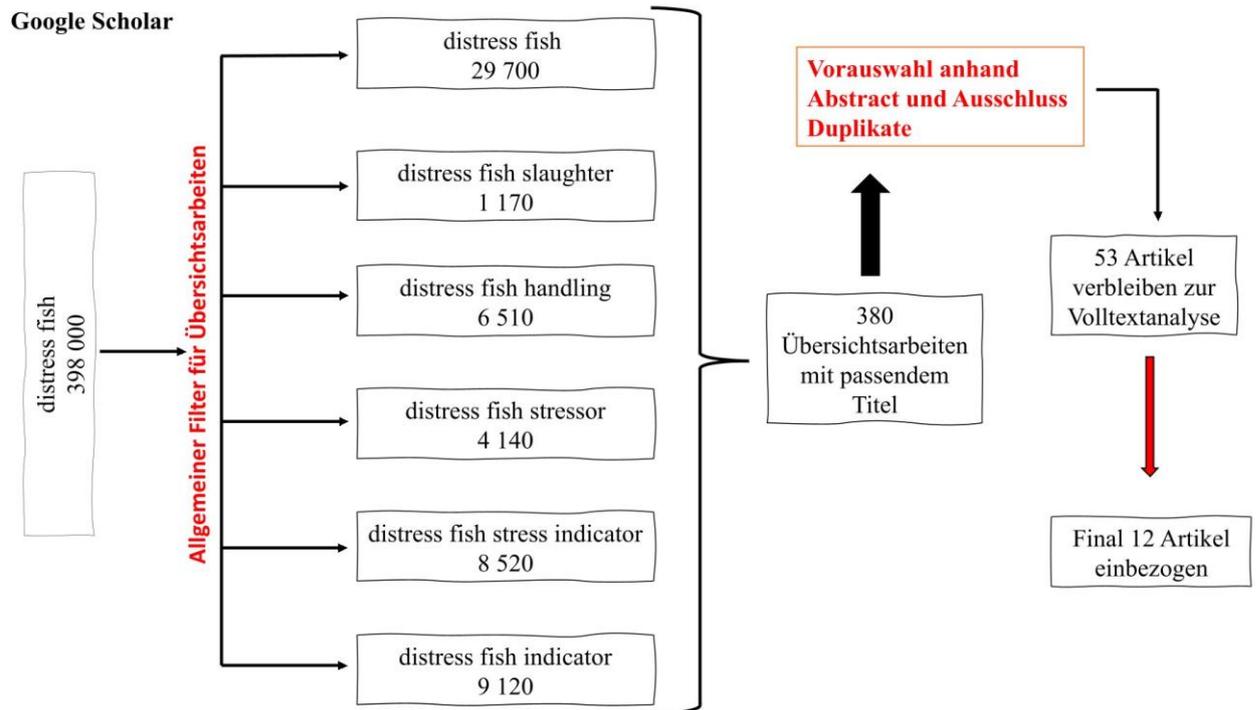


Abbildung 5: Graphische Darstellung des Auswahlverfahrens zur gefundenen Literatur auf Google Scholar.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Hälterung

Fische in Aquakulturen werden traditionell gefastet. Das bedeutet, dass ihnen am Ende der Produktion (vor der Schlachtung) für einige Zeit das Futter entzogen wird. Diese sogenannte Hälterung dient dazu den Verdauungstrakt der Speisefische zu entleeren, sodass fäkale Verschmutzungen des Wassers im Becken bzw. beim Transport verhindert werden. Aufgrund von Tradition und Arbeitskomfort dauern diese Hälterungsperioden oft länger an als notwendig (siehe Bestimmungen zur Hälterung der Tierschutz-Schlacht-Verordnung, Kapitel 1.2). Da noch der Irrglaube besteht, dass eine lange Fastenzeit die Qualität des Fleisches verbessert. Lines und Spence (2014) schreiben, dass Forellen ihren Darm bereits nach 24h entleert zu haben scheinen und weiteres Fasten bis zu drei Tage keine Auswirkungen auf Körpergewicht oder andere biochemische Stressindikatoren hat. Wobei eine einfühlsame Bewertung der Auswirkungen des Futterentzugs, auf das Wohlergehen der Fische, schwierig ist. Diese können ihre Stoffwechselrate an die Verfügbarkeit von Nahrung anpassen. Auch Raposo De Magalhaes et. al. (2020) beschreibt einen ähnlichen Zugang in Zusammenhang mit dem Cortisolspiegel als Stressindikator bei Fischen. Bei chronischem Stress stellt sich der Plasmacortisolspiegel als unzuverlässiger Parameter heraus, was auf eine hohe Variabilität der Reaktionswerte und die Tatsache, dass die Tiere sich an chronischen Stress in gewisser Weise anpassen können und die Cortisolreaktion abgeschwächt wird, zurückzuführen ist (Raposo De Magalhães et al., 2020).

Barton et. al. zeigte bereits 1987 in einer Studie mit Regenbogenforellen, dass sich eine Desensibilisierung gegenüber wiederholten Stressoren, in einem Zeitraum von 10 Wochen, zeigt. Der Plasmacortisolspiegel und der Plasmaglukosespiegel waren am Ende der Studie signifikant geringer als der zuvor ungestressten Fische. Dies deutet auf eine allgemeine Gewöhnung hin. Erklärungen dafür könnten sein, dass durch die Abstumpfung der Fische auf wiederholende Stressoren, nachfolgende Stressoren nur mehr abgeschwächte oder keine Reaktion mehr auslösen (Barton, 2002). Oder aufgrund der Strategie der Stoffwechseleerhaltung können Fische in einen anaeroben Zustand umschalten, um die Energie dafür zu decken. Dies

wiederum blockiert aber Stressreaktionen (z.B.: Cortisolausschüttung) wodurch die Abwehrsysteme nicht ausgelöst werden (Petitjean et al., 2019). Im Hinblick auf Futterentzug bedeutet das für viele Fische, dass über einige Wochen ein solches Ereignis nicht unbedingt ihr Wohlergehen beeinträchtigt. Jedoch geht man davon aus, dass man langfristig gesehen die Tiere in ein Stadium des Verhungerns zwingt, und das sehr wohl Stress verursacht und Auswirkungen auf das Tierwohl hat. Ein Zustand des Verhungerns schränkt die Funktionen lebenswichtiger Organe, durch den Proteinabbau zur Mobilisierung der gespeicherten Nährstoffe, ein (Gaffney & Lavery, 2022). Aber auch eine weniger strenge Futterrestriktion kann Auswirkungen auf das Verhalten haben, wenn diese ganz plötzlich stattfindet. Das „Farm Animal Welfare Committee“ der britischen Regierung berichtet über eine höhere Aggressionsrate und damit verbundene schwerere Flossenverletzungen, wenn Futter plötzlich minimiert wird (Gaffney & Lavery, 2022). Die Studie von Hastein et. al. (2005) bildet ähnliche Erkenntnisse ab. Zwar sind die Tierschutzaspekte des Stresses durch reduzierte Fütterung noch nicht vollständig untersucht worden, doch steigt die Aggression der Fische bei suboptimalem Nahrungsangebot. Einige Tiere zeigen Verhaltensanomalien, wie Augenschnappen oder „Bum Eye Disease“ und es kann auch zu Schwanzbeißen, Kannibalismus und physischen Flossenschäden kommen. Daher sollte die Hungerperiode so kurz wie möglich sein. Bei Salmoniden beträgt die maximale Hälterungszeit ein bis drei Tage, je nach Wassertemperatur (Håstein et al., 2005). Ein durchgeführter Versuch zum Fasten bei Regenbogenforellen lieferte das Ergebnis, dass 5 Tage ohne Nahrung keine oder nur geringe Auswirkungen auf Stoffwechsel- oder Stressindikatoren, wie Cortisol, haben (Bermejo-Poza et al., 2019). Hingegen 10 oder 20 Tage Fasten zeigten erhebliche Veränderungen des Lebergewichts und der Plasmakonzentrationen von Metaboliten des Energiestoffwechsels. Allerdings behielten die Forellen auch nach 20 Tagen Fasten die Basalwerte von Plasmaionen und AChE (Acetylcholinesterase) im Gehirn bei, was ihre Bedeutung für die Homöostase und die Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen unterstreicht (Bermejo-Poza et al., 2019).

Ein neuer Ansatz der Stressforschung ist die Proteomik (Raposo De Magalhães et al., 2020; Raposo De Magalhães et al., 2018; Rodrigues et al., 2012). Die Proteomik dient der Erforschung aller Proteine in einer Zelle oder einem Lebewesen, welche zu einem gewissen Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen vorliegen (Rodrigues et al., 2012).

Die häufigsten Stressindikatoren sind Cortisol, Glukose und Laktat. Aber aufgrund ihrer hohen Variabilität und da ihre Sekretion von vielen Faktoren abhängig ist, sind sie möglicherweise nicht die zuverlässigsten Parameter. Daher werden andere Messungen ergänzt, wie andere Stresshormone, Blutzellzahlen (vorzugsweise in chronischen Experimenten), um ein vollständigeres Bild über das Wohlergehen der Individuen zu erhalten (Raposo de Magalhães et al., 2018). Von zunehmender Bedeutung als geeignete Alternative ist auch die Proteomik zur Bewertung des Wohlergehens der Fische. Da Proteine die Hauptrolle bei allen physiologischen Prozessen spielen, können einige von ihnen als potenzielle Marker dienen (Raposo De Magalhães et al., 2020). Es werden erste proteomische Ansätze in Ernährungsstudien eingesetzt. Getestet wurde die Reaktion des Leberproteoms auf Fasten und Wiederaufnahme der Nahrung bei verschiedenen Fischen (Rodrigues et al., 2012). Als Reaktion auf eine 14-tägige Fastenperiode wurden in der Leber der Regenbogenforelle 24 unterschiedlich exprimierte Proteine nachgewiesen. Zu den Proteinen mit erhöhter Abundanz nach dem Fasten gehörten einerseits Enolase und Cytochrom-C-Oxidase und andererseits Cathepsin D, was höchstwahrscheinlich mit dem höheren Energiebedarf bzw. Proteinabbau während des Fastens zusammenhängt (Rodrigues et al., 2012). Auch wurden beim Vergleich der Veränderungen im hepatischen mitochondrialen Proteom von Zebrafischen, die einer Hungersnot (15 Tage) und einer erneuten Fütterung (7 Tage) ausgesetzt waren, 18 Proteine identifiziert, die darauf hindeuten, dass die Hungersnot zu einer Verringerung der Glykolyse und einem Anstieg der Glukoneogenese führte, während die erneute Fütterung diese Aktivitäten wieder auf ein normales Niveau brachte. Die Expressionsmuster mehrerer Proteine, die mit dem Fettsäure- und Aminosäurestoffwechsel in Verbindung stehen, deuten ebenfalls auf die Nutzung von Nicht-Kohlenhydrat-Ressourcen zur Energiegewinnung während des Hungers hin (Rodrigues et al., 2012). Proteine mit chaperonierender und antioxidativer Funktion, wie das glukoseregulierte Protein, die Paraxonase und das Hitzeschockprotein, wurden ebenfalls unter Hungerbedingungen hochreguliert. Ein proteomischer Ansatz mit Zebrafischen wurde auch verwendet, um die metabolischen Auswirkungen einer variablen Energiezufuhr mit der Nahrung zu bewerten (Rodrigues et al., 2012). Es wurden 29 Proteinspots identifiziert, die sich zwischen den Behandlungen unterscheiden. Die signifikantesten Proteinveränderungen, die mit einer hohen Kalorienzufuhr einhergingen, standen im Zusammenhang mit einer Abnahme der

sauerstoffbindenden Aktivität, insbesondere der häm-bindenden Proteine (Rodrigues et al., 2012).

Zu der Hälterung gehören noch weitere Arbeitsschritte, wie das Herausfischen und Umsetzen, oder das Transportieren zur Schlachtungsanlage. Der Begriff, vor allem für das Herausfischen, Umsetzen und Sortieren, wird in der Literatur als „Handling“ bezeichnet. Und jeder dieser einzelnen „Handling“ Schritte verursacht auch Stress bei den Fischen. Eine Studie von Ellis et al. (2004) untersuchte dazu eine nicht-invasive Methode zur Probenahme von Cortisol aus dem Tankwasser. Hierzu wurden 3 Versuchsgruppen zu je 67 Regenbogenforellen pro Tank gebildet. Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe, eine Gruppe wurde einmal einem akuten Stressor ausgesetzt und die dritte Gruppe wurde im Abstand von je 45 Minuten insgesamt dreimal gestresst. Der Stressfaktor hierbei war ein Herausfischen durch ein Netz und das Halten an der Luft für 90 Sekunden. Bei der Wasserentnahme vor und nach dem Stressor, zeigten sich signifikant hohe Unterschiede in der Cortisolkonzentration. Die beiden gestressten Gruppen zeigten eine Cortisolkonzentration von  $25,2 \pm 3,4$  ng/L bis zu  $107,2 \pm 15,9$  ng/L. Hingegen die Kontrollgruppe blieb stetig bei einem Wert, des gelösten Cortisols im Wasser, von  $1,1 \pm 0,1$  ng/L (Ellis et al., 2004).

Eine weitere Untersuchung mit Regenbogenforellen versuchte das Stressempfinden aufgrund der Cortisolausschüttung im Hautschleim der Fische nachzuverfolgen (Carbajal et al., 2019). In 5 Gruppen mit einer Besatzdichte von  $30 \text{ kg/m}^3$  wurde ein Begrenzungsnetz von  $45 \times 25 \times 25 \text{ cm}$  installiert. Durch diese Platzreduktion erlitten die Fische Stress, welcher direkt zu einem Anstieg der Plasmacortisolwerte führte und diese bis 24 Stunden danach erhöht blieben (Carbajal et al., 2019). Auch der Cortisolwert im Hautschleim spiegelte den Verlauf im Blut wider. Der Spitzenwert von Cortisol im Hautschleim wurde nach einer Stunde und nach sechs Stunden beobachtet. Nach 24 Stunden nahm dieser Wert wieder ab, was auf den Rückkopplungseffekt von Cortisol selbst hindeutet (Carbajal et al., 2019). Um „Handling“ Stress nachzuempfinden, wurde in einem Versuch von Eissa et al. (2017) das Abwiegen der Fische praktiziert. Es wurden drei Versuchsgruppe zu unterschiedlichen Wassertemperaturen von 14, 20 und  $26 \text{ }^\circ\text{C}$  gebildet (80 Fische/ 400L). Von drei Fischen pro Gruppe wurden Blut- und Leberparameter bestimmt. Es zeigte sich, dass unmittelbar nach dem Wiegeprozess die Serum- und Leberproteinkonzentration von Hsp70 (Hitzeschockprotein 70)

und die hepatische mRNA-Konzentration von Hsp70 bei Wassertemperaturen von 14 °C und 26 °C hochreguliert wurde, während sie bei 20 °C signifikant herunterreguliert wurde (Eissa et al., 2017). Zusätzlich untersuchte die Studie die Expression von oxidativen Stressgenen. Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase und Superoxiddismutase wurden bei einer Wassertemperatur von 26 °C signifikant hochreguliert im Vergleich zu 14 °C und 20 °C. Die Autor:innen erkannten somit nicht nur eine Stressreaktion nach einem menschlichen Eingriff, sondern auch einen Stressfaktor von zu hohen Wassertemperaturen für die Fische (Eissa et al., 2017).

Auch speziell die Besatzdichte der einzelnen Tanks spielt eine große Rolle für das Wohlbefinden der Fische. Die österreichische Gesetzgebung sieht für Forellen, Karpfen, Welse, Hechte und Aale ein gewisses maximales Gewicht aller Fische pro 1000L vor (siehe Kapitel 1.2 – gesetzliche Regelungen). Doch zeigen Studien, dass sogar Fische in weniger stark besetzten Tanks Stress empfinden können. Eine Studie mit afrikanischen Welsen untersuchte in 120L Becken jeweils eine Besatzdichte von 500, 1125, 1750, 2375 und 3000 Fische/m<sup>3</sup> (van de Nieuwegiessen et al., 2008). Ausgehend von 10 g schweren Jungfischen, wurden die Welse 48 Tage lang aufgezogen. Somit lag die Dichte der Fische in einigen Becken unter dem durchschnittlichen Besatz. Die Versuchsgruppe mit der niedrigsten Dichte zeigte ein hochgradiges aggressives Verhalten gegeneinander. Hingegen die Gruppe mit der höchsten Besatzung zeigte vermehrtes Fluchtverhalten und versuchte aus dem Becken zu springen (van de Nieuwegiessen et al., 2008).

Bei einem weiteren Experiment mit Regenbogenforellen wurden juvenile Tiere in achteckige Betonbecken (2500L), zu drei unterschiedlichen Besatzdichten, gegeben (Zahedi et al., 2019). Zwei Monate lang wurden Fische zu je 12 kg/m<sup>3</sup> (geringe Dichte), 24 kg/m<sup>3</sup> (mittlere Dichte) und 40 bzw. 44 kg/m<sup>3</sup> (hohe Dichte) gehalten. Um die Besatzdichte trotz Wachstum einzuhalten, wurden wöchentlich Fische entnommen (Zahedi et al., 2019). Die Fische der mittleren und hohen Dichte zeigten eine Mortalität von 1,5 % bzw. 2,5 % und bei hoher Dichte ein verringertes Körpergewicht im Vergleich zu den anderen Gruppen. Hingegen die Plasmacortisolwerte zeigten keine signifikanten Unterschiede unter den Versuchsgruppen. Auch Hitzeschock-Proteine wurden alle 20 Tage über RT-PCR (Realtime-PCR) untersucht. Es wurde festgestellt, dass bei hoher Besatzdichte, an allen Tagen der Probeziehung die Expression

des Hitzeschock-Proteins 70 hochreguliert war (3,6-fach; 2,4-fach und 6,2-fach) (Zahedi et al., 2019).

Eine Studie von Naderi et al. (2017) untersuchte Auswirkungen von chronisch zu dicht besetzten Forellen Becken auf die Leberenzyme- und proteine. Die Fische, die bei hoher Besatzdichte (80 kg/m<sup>3</sup>) aufgezogen wurden, wiesen nach 60 Tagen der Aufzucht signifikant höhere Aktivitäten von Katalase, Glutathion-Peroxidase und Superoxiddismutase sowie einen höheren Malondialdehyd-Gehalt in der Leber auf als die Gruppe mit niedriger Besatzdichte (20 kg/m<sup>3</sup>). Dies sind Biomarker für oxidativen Stress (Naderi et al., 2017). Auch zwei hochregulierte Leberproteine wurden in der Gruppe mit hoher Besatzdichte identifiziert. Die Vorläuferstufe des Apolipoproteins A-I-2 und das mitochondriale Stressprotein 70. Die Autor:innen erklären das erhöhte Apolipoprotein darin, dass dieses für den Lipidtransport verantwortlich ist und somit zu einem effizienteren Fettstoffwechsel beitragen könnte, um den Energiebedarf zu decken, der unter chronischem Stress entsteht (Naderi et al., 2017).

## 3.2 Schlachtung

### 3.2.1 Betäubungsverfahren

Tabelle 1: Darstellung der in Österreich gängigen Betäubungsverfahren anhand der Leitlinie für eine gute Hygienepraxis für die Schlachtung und Verarbeitung von Fischen aus Wildfang oder eigener Aquakultur.

Herausgegeben vom Bundesministerium für Gesundheit, 2012.

Betäubungsmethode	Art der Betäubung	Erklärung
Mechanisch	Kopfschlag	Mit einem harten, stumpfen Gegenstand (sog. Priester) wird mit entsprechender Kraft ein gezielter Schlag auf das Hinterhaupt des Fisches ausgeübt
	Spiking/Coring	Ein spitzer „Dorn“ wird mit Luftdruck in das Gehirn gerammt und somit dieses physisch zerstört
Elektrisch	Wasserbad	Elektroden werden so im Wasser angebracht, dass überall derselbe Stromfluss gewährleistet ist. Bei einer bestimmten Stromstärke und Dauer werden Fische unter Wasser betäubt
	Trocken	Fische werden aus dem Wasser genommen und meist mit dem Kopf zuerst an Elektroden geführt
Sonstige (→ müssen explizit vom Landeshauptmann/ von der Landeshauptfrau freigegeben werden)	Eiswasser	Die Fische werden entweder in ein Becken mit Eis umgesetzt oder das bestehende Wasser im Becken wird mit Eiswasser ersetzt
	Mischformen	+ Eiswasser und Kopfschlag + Elektrische Betäubung und Kopfschlag

## KOPFSCHLAG

Die Methode des Kopfschlags wird häufig bei Lachsen, Forellen und anderen größeren Fischen angewandt. Die Fische müssen einzeln aus dem Wasser genommen werden und durch einen gezielten und starken Schlag auf den Hinterkopf kommt es zu einer Gehirnerschütterung und damit einhergehenden Dysfunktion des Gehirns (Poli et al., 2004). Robb et al. (2000) stellten fest, dass die mechanische Betäubung bei Lachsen zum sofortigen Verlust von VERs führte. Diese VERs sind visuell evozierte Reaktionen, also Hirnreaktionen auf Lichtimpulse, welche man in einem Elektroenzephalogramm (EEG) darstellen kann (Kumar et al., 2022). Sind die Schläge jedoch falsch platziert oder nicht ausreichend kräftig, so verlängert sich der Verlust des Bewusstseins um bis zu 334 Sekunden (Robb et al., 2000). Bei einer Untersuchung von Retter et al. (2018) auf herkömmlichen Karpfenzuchtbetrieben wurde das Betäubungsverfahren des Kopfschlags im Vergleich zur elektrischen Betäubung und einer Mischform von elektrischer Betäubung und anschließender Perkussion untersucht. Dabei fanden die Autor:innen bei den Karpfen, welche mit Kopfschlag betäubt wurden, mittlere Cortisolwerte von  $228,3 \pm 99,9$  ng/ml und waren somit signifikant höher als in anderen Betrieben mit anderen Betäubungsmethoden. Auch bei den Glukosewerten gab es große Unterschiede, wobei die mittleren Werte zwischen  $6,7 \pm 5,6$  mmol/L lagen. Dies war wiederum signifikant höher als bei Karpfen, welche elektrisch betäubt wurden (Retter et al., 2018). Die mittleren Plasmanatriumwerte bei der Betäubung mittels Kopfschlag waren bei  $137,3 \pm 8,1$  mmol/L und waren im Vergleich zur elektrischen Betäubung höher. Hingegen die Hämatokritwerte bei der Schlagbetäubung waren mit  $27,4 \pm 4,2$  % signifikant niedriger als die Werte bei allen anderen Betäubungsmethoden. Die durchschnittlichen Laktatwerte unterschieden sich jedoch nicht zwischen den Betäubungsmethoden (Retter et al., 2018).

Weitere Studien zur Untersuchung des Kopfschlags als Stressor lieferten ähnliche Ergebnisse. Bei der Bestimmung von Cortisol- und Glukosewerten im Blut von Karpfen konnte man Werte von 65 bis 675 ng/ml Cortisol und 3,9 mmol/L Glukose nachweisen. Dies spricht für eine leichte Stresssituation, jedoch die Spannweite der Messwerte zeugt von einer individuellen neuroendokrinen Reaktion (Daskalova et al., 2016).

Die mechanische Betäubung bei Welsen führt zwar bei korrekter Ausführung zur augenblicklichen Bewusstlosigkeit, jedoch birgt es aufgrund der Anatomie des Kopfes ein hohes Risiko für Fehlschläge (Brijs et al., 2021). In der Studie wurden von 58 Welsen, 64%

unwiderruflich betäubt. Hingegen 36% erlangten erneut das Bewusstsein nach 2,1 bis 11,1 Minuten (Brijs et al., 2021).

### SPIKING

Diese Methode wird vorwiegend bei Thunfisch und Lachsen angewandt, aber findet auch schon Anwendung bei Welsen (Poli et al., 2004)

Robb et al. (2000) berichteten, dass korrekt platzierte Spikes zwar zum unmittelbaren Verlust von VERs führen, aber 50 % aller durchgeführten Betäubungen ungenau waren und somit die Fische bis zu 300 Sekunden länger brauchten, um das Bewusstsein zu verlieren. In dieser Zeit zeigten die Lachse aversives Verhalten, welches als Schmerzempfinden interpretiert wurde (Robb et al., 2000). Um den Grad der Sensibilität des Gehirns eines Tieres zu messen, ist es nützlich, einen bestimmten Signalweg zu stimulieren und die Reaktion aufzuzeichnen und zu analysieren. Da die Sehbahn relativ einfach ist, ist sie eine der letzten Reaktionen, die verloren geht, wenn das Gehirn eines Tieres zu Grunde geht oder eine schwere Funktionsstörung erleidet. Die Stimulierung der Sehbahn ist daher eine nützliche Methode zur Bewertung der Gehirnfunktion, vor allem bei Lachsen, da diese Tiere sehr empfindlich auf visuelle Reize reagieren und einen großen Sehnerv besitzen (Robb et al., 2000).

### ELEKTRISCHE BETÄUBUNG

Diese Methode wird hauptsächlich bei Süßwasserfischen angewandt. Hier wird zwischen der nassen elektrischen Betäubung und der trockenen elektrischen Betäubung unterschieden (siehe Tabelle 1).

Je nach Dauer und Stromstärke können bei den Fischen schnelle und heftige Reaktionen, wie aufgerissenes Maul und Augen, Muskelblutflecken und Wirbelbrüche hervorgerufen werden (Poli et al., 2004).

Der Vorteil bei der Nassbetäubung kann sein, dass mehrere Fische in einem Becken gleichzeitig betäubt werden können. Dadurch kann der Stress des Herausfangens und Fixierens reduziert werden und so das Tierwohl gesteigert werden (Lines & Spence, 2014).

Eine Studie von Gräns et al. (2015) untersuchte unter anderem die trockene elektrische Betäubung bei Saiblingen. Dabei wurden die Saiblinge über ein Förderband transportiert und

in einem elektrischen Betäubungssystem einer Kombination aus 80 Volt Gleichstrom und 10 Volt Wechselstrom mit einer Frequenz von 100 Hertz für circa 10 Sekunden ausgesetzt (Gräns et al., 2015). Alle Fische zeigten eine sofortige Unbeweglichkeit und Verlust der aufrechten Schwimmstellung. Jedoch zeigte sich in den signifikant erhöhten Blutplasmawerten (Cortisol 35 ng/ml; Hämatokrit 42 %; Hämoglobin 91 g/L), dass die Fische einer hohen Stressreaktion ausgesetzt waren. Was sich wiederum mit ihrer weniger ausgeprägten Verhaltensreaktion widersprach (Gräns et al., 2015). Dies lies die Autor:innen darauf schließen, dass die Fische nicht betäubt waren, sondern lediglich immobilisiert.

Die bereits erwähnte Studie von Retter et al. (2018) fand bei Karpfen, welche elektrisch betäubt (Nassbetäubung) wurden, weniger hohe Stressreaktionen als bei jenen die mechanisch betäubt wurden. Die mittleren Cortisolwerte lagen bei der elektrischen Betäubung bei  $114 \pm 76,5$  ng/ml, die Plasmaglukosewerte bei  $3,2 \pm 1,4$  mmol/L, die mittleren Hämatokritwerte lagen bei  $34,4 \pm 6,3$  % und die Laktatwerte bei  $5,9 \pm 4,1$  mmol/L. Anzumerken ist, dass die Hämatokritwerte im Vergleich zu anderen Betäubungsmethoden signifikant höher waren und die Laktatwerte sich zwischen den Betäubungsmethoden nicht unterschieden. Die Betäubungssysteme generierten in allen Betrieben eine Stromspannung von 29 bis 54 Volt, was bedeutet, dass eine Stromstärke von 0,023 bis 0,146 Ampere/dm<sup>2</sup> herrschte (Retter et al., 2018).

Ein weiterer Versuch mit schlachtreifen Karpfen ergab, dass eine Stromstärke von 4,7 mA und eine hohe Spannung von 300 Volt zwar effektiv war, aber für einige wenige Fische eine Stressbelastung darstellte. Plasmacortisolwerte von über 800 ng/ml und Glukosewerte von durchschnittlich 6,05 mmol/L bestätigen die Annahme, dass die Stromstärke für die Größe der Fische zu niedrig war (Daskalova et al., 2016).

## EISWASSER

Das Eintauchen von Fischen in Eiswasser wird immer häufiger praktiziert. Viele Fischzüchter:innen berichten von einer Immobilisation der Tiere und dadurch leichtere Handhabung bei nachfolgenden Schritten, wie z.B. Kopfschlag. Eiswasser kann die Hirnaktivität zwar verringern, führt in den seltensten Fällen jedoch zu Empfindungslosigkeit (Lambooij et al., 2015). Wodurch viele Autor:innen davon ausgehen, dass die Fische bei dieser Methode enormen Stress empfinden.

In einer Studie von Wallace et al. von 2018 zeigten Zebrafische in allen Versuchsgruppen Anzeichen von Stress und Schmerzen, welche sich durch Zuckungen und unregelmäßiges Schwimmen äußerten. Weitere Studien zeigen, dass durch die sinkende Körpertemperatur und Stoffwechselrate, auch der Sauerstoffbedarf der Fische sinkt und sich so die Zeit bis zur Bewusstlosigkeit oder sogar Tod verlängern kann (Poli et al., 2004).

Das „Farm Animal Welfare Committee (FAWC)“ diskutierte auf Basis dieser Erkenntnisse über einen langen Zeitraum, ob man diese Art der Betäubung oder Tötung für Forellen allgemein verbieten sollte. Grund dafür ist eine Betäubungsdauer von bis zu 198 Minuten, währenddessen Forellen auf Reize reagieren (Poli et al., 2004). Auch Lines J. und Spence J. (2014) kommen zu dem Schluss, dass eine Betäubung mit Eiswasser oder Eisbrei die Fische zwar zu lähmen scheint, aber die Gehirnaktivität bleibt über lange Zeit erhalten. Somit gehen sie davon aus, dass diese Methode Stress und Leiden verursacht (Lines & Spence, 2014).

Ein typisches Betäubungsverfahren stellt das Eiswasser bei afrikanischen Welsen dar. Eine Studie bei der unterschiedliche Betäubungsverfahren getestet wurden, fand heraus, dass das Legen auf Eis für Fische nie ohne vermeidbare Schmerzen, Angst, Furcht und Leiden geschehen kann. Körperbewegungen hörten zwar nach 1,9 bis 6,3 Minuten auf, jedoch zeigten die Welse während circa 55 % der Zeit bis zur Bewegungslosigkeit ein deutliches Fluchtverhalten (energisches um sich schlagen und Versuche aus dem Becken zu entkommen) (Brijs et al., 2021). Auch wurde dargelegt, dass die Welse bewegungslos werden, bevor die VER-Aktivität stoppte. Somit herrscht das Risiko, dass man die Bewegungslosigkeit mit der Empfindungslosigkeit gleichsetzt und die Fische bei vollem Bewusstsein tötet (Brijs et al., 2021).

## MISCHFORMEN

Elektrische Betäubung und Kopfschlag: Die bereits mehrfach erwähnte Studie von Retter et al. (2018) untersuchte Karpfenbetriebe in Deutschland, welche eine Mischform der Betäubung aus zuerst elektrischer Betäubung mit darauffolgender Perkussion anwendeten. Im Gegensatz zu der herkömmlichen Perkussion, zeigten die Fische bei dieser Methode niedrigere Blutplasmawerte von Cortisol (durchschnittlich  $150 \pm 35$  ng/ml). Weiters wurden bei jedem Tier auffällige Verhaltensweisen kontrolliert, wie abnormer Augenrollreflex, erhöhte

Atemfrequenz, unkontrollierte Zuckungen und Fluchtverhalten (Retter et al., 2018). Andere Blutplasmaparameter wie Glukose und Laktat unterschieden sich bei der Kombination von elektrischer Betäubung und Perkussion nicht von der alleinigen Anwendung der Perkussion (Retter et al., 2018).

### 3.3 Zusammenfassung und Gegenüberstellung Stressor/ -en und gemessene Stressparameter

Abschließend wird anhand von Tab. 2 versucht, die in der Fachliteratur gemessenen Stressparameter mit den darin vorkommenden Stressoren zu verbinden und übersichtlicher darzustellen. Die farbigen Hinterlegungen dienen für eine bessere Verknüpfung mit der am Ende abgebildeten Zuordnung dieser Stressparameter zu den einzelnen Ebenen der Stressantwort bei Fischen (Abb. 6).

Tabelle 2: Auflistung der in der Literatur verwendeten Stressoren mit den dazu gemessenen Stressparameter.

<b>Autor:innen</b>	<b>Stressor/ -en</b>	<b>Stressparameter</b>
T. Ellis, J. D. James, C. Stewart, A. P. Scott (2004)	90sek an der Luft halten	Cortisol im Wasser
P. Kumar, A. A. Abubakar, A. Sazili, U. Kaka, Yong-Meng Goh (2022)	Perkussion mit Luftdruck 8-10 bar, elektrische Betäubung über 10sek bei über 1 A/dm <sup>2</sup>	Fehlen von visuell evozierten Reaktionen im EEG
P. G. van de Nieuwegiessen, A. S. Boerlage, J. A.J. Verreth, J. W. Schrama (2008)	Unterschiedliche Besatzdichten in 120L Tanks	Wachstumsleistung, Blutplasmawerte von Laktat, Glukose und Cortisol, Verhaltensweisen
A. Carbajal, F. E. Reyes-López, O. Tallo-Parra, M. Lopez-Bejar, L. Tort (2019)	Hohe Besatzdichten, Fangnetze	Cortisol in Hautschleim und Schuppen
S. C. Kestin, S. B. Wotton, N. G. Gregory (1991)	Entnahme aus dem Wasser, Tod durch Sauerstoffmangel	Hirnfunktionen, visuell evozierte Reaktionen im EEG

S. Zahedi, A. Akbarzadeh, J. Mehrzad, A. Noori, M. Harsij (2019)	Unterschiedliche Besatzdichten in 2500L Becken	Wachstumsleistung, Cortisol im Blut, Genexpressionen im Muskel
M. Naderi, S. Keyvanshokoo, A. P. Salati, A. Ghaedi (2017)	Hohe Besatzdichten	Wachstumsleistung, Proteinidentifizierung in der Leber
A. Concollato, A. D Zotte, S. C Vargas, M. Cullere, G. Secci, G. Parisi (2018)	Elektrische Betäubung für 30sek bei 180V, Asphyxie über 15min, Kohlenstoffmonoxidbetäubung	Tropfwasserverlust, Textur, pH, Farbe, Fettoxidation, Frische des Fillets
N. Eissa, Han-Ping Wang, H. Yao, Zhi-Gang Shen, A. A. Shaheen, E. N. Abou-ElGheit (2017)	Fangen mit Netz, Wiegen	Proteinanalyse (Biomarker) in Blut und Lebergewebe
B. M. Poli, G. Parisi, F. Scappini, G. Zampacavallo (2004)	Tod durch Sauerstoffmangel, Eiswasser-Betäubung, CO2 Narkose, elektrische Betäubung, Kopfschlag, Spiking	Blutplasmawerte von Laktat, Glukose, Hämatokrit und Cortisol, Muskel pH- Wert
J. Brijs, E. Sundell, P. Hjelmstedt, C. Berg, I. Senčić, E. Sandblom, M. Axelsson, J. Lines, J. Bouwsema, M. Ellis, A. Saxer, A. Gräns (2021)	Betäubung in Eiswasser, elektrische Betäubung (1,7 A/dm <sup>2</sup> ), Kopfschlag	Fehlen von visuell evozierten Reaktionen im EEG, Verhaltensweisen

A. Daskalova, A. Pavlov, R. Kyuchukova, H. Daskalov (2016)	Kopfschlag, Tod durch Sauerstoffmangel, elektrische Betäubung über 3sek bei 4,7 mA und über 300V	Blutplasmawerte von Glukose und Cortisol, Tropfwasserverlust des Fillets
V. Jung-Schroers, U. Hildebrandt, K. Retter, K.-H. Esser, J. Hellmann, D. W. Kleingeld, K. Rohn, D. Steinhagen (2020)	Elektrische Betäubung über 30sek oder 60sek bei 50V	Visuell evozierte Reaktionen im EEG, Verhaltensweisen, Blutplasmawerte von Hämatokrit, Glukose, Laktat und Cortisol
R. Bermejo-Poza, M. Fernández-Muela, J. De la Fuente, C. Pérez, E. González de Chavarri, M. T. Díaz, F. Torrent, M. Villarroel (2018)	Futterentzug für 5, 10 und 20 Tage	Wachstumsleistungen, Blutplasmawerte von Glukose, Laktat und Cortisol
C. Raposo de Magalhães, D. Schrama, A. P. Farinha, D. Revets, A. Kuehn, S. Planchon, P. Miguel Rodrigues, M. Cerqueira (2020)	Hohe Besatzdichten, Hypoxie, Fangen mit Netz	Blutplasmawerte von Laktat, Glukose und Cortisol, Muskel pH-Wert, Proteinanalyse in Blut
A. Gräns, L. Niklasson, E. Sandblom, K. Sundell, B. Algers, C. Berg, T. Lundh, M. Axelsson, H. Sundh, A. Kiessling (2015)	CO2 Narkose, elektrische Betäubung über 10sek bei 80V und 100Hz	Blutplasmawerte von Hämatokrit, Hämoglobin und Cortisol, Verhaltensweisen

<p>K. Retter, K.-H. Esser, M. Lüpke, J. Hellmann, D. Steinhagen, V. Jung-Schroers (2018)</p>	<p>Kopfschlag, elektrische Betäubung bei 0,09 bis 0,41 A/dm<sup>2</sup></p>	<p>Fehlen von visuell evozierten Reaktionen im EEG, Verhaltensweisen, Blutplasmawerte von Laktat, Glukose, Natrium und Cortisol</p>
--	---	---

Die gemessenen Stressparameter beziehen sich wie folgt auf die drei beschriebenen Ebenen der Stressantwort:

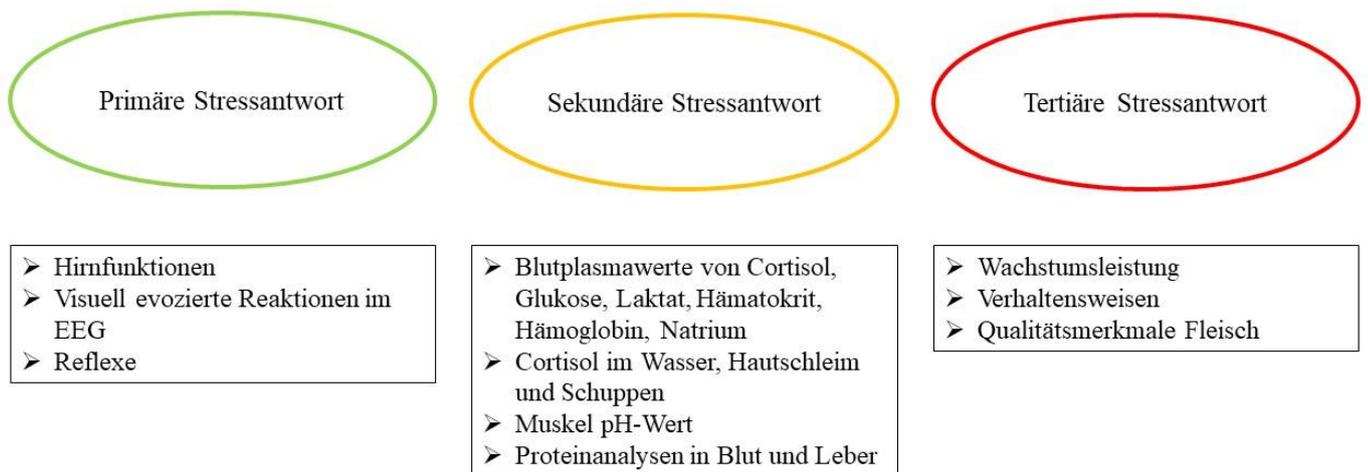


Abbildung 6: Zuordnung der gemessenen Stressparameter zu den drei Ebenen der Stressantwort der Fische.

#### 4. Diskussion

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit lautet, dass angenommen wird, dass dieselben biochemischen Grundlagen der Stressantwort bei Fischen bei Kurzzeit- und Langzeitstress vorliegen. Somit würden dieselben Stressparameter bei Hälterung und Schlachtung Anwendung finden.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde eine Literaturrecherche auf den Internetseiten PubMed und Google Scholar durchgeführt. Es wurden 23 für Studierende der Vetmeduni zugängliche wissenschaftliche Arbeiten als Literatur einbezogen. Auch von Researchgate sind relevante Artikel eingearbeitet worden (siehe Kapitel 2).

Aufgrund eines Suchfehlers, welcher erst gegen Ende der Abschrift bemerkt wurde, wurde die Untersuchung der Literatur auch auf die Verzeichnisse der Publikationen ausgeweitet.

Die Hypothese kann, nach abgeschlossener Evaluierung der Literatur, widerlegt werden.

Die Stressantwort beginnt immer über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. Die sympathischen Nervenfasern stimulieren die Freisetzung von Katecholaminen. Die Katecholamine werden ins Blut freigesetzt und aktivieren verschiedene Rezeptoren, welche Glukose ausschütten lassen (Pankhurst, 2011; Petitjean et al., 2019). Weiters beginnt über die HHN-Achse eine verzögerte Freisetzung von Corticotropin-Releasing-Hormon aus dem Hypothalamus, was die Sekretion von ACTH anregt. Dieses zirkulierende ACTH wiederum stimuliert die Synthese von Kortikosteroiden in den Blutkreislauf. Dadurch steigt der Plasmacortisolspiegel, was abermals zur Mobilisierung von Energie durch Glukoseausschüttung führt (Pankhurst, 2011; Petitjean et al., 2019).

Jedoch liegt der Unterschied der Stressantwort bei der Dauer der Aktivierung. Bei chronischem Stress, das heißt bei einer andauernden bzw. wiederholten Belastung über einen Zeitraum von mehr als zwei Wochen, kann neben der Aktivierung der HHN-Achse auch oxidativer Stress entstehen (Hoem & Tveten, 2020). Dieser äußert sich durch eine Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Leber, Gehirn und Muskeln, welche die Zellen und das Gewebe schädigen können. Weiters ist bei chronischem Stress (= Langzeitstress) eine Veränderung der

Hitzeschockproteine (HSP) zu erkennen. Diese können bei Überexpression den Energiebedarf der Fische erhöhen und zu einer gestörten Proteinzusammensetzung führen (Eissa et al., 2017).

In Tab. 2 in Kapitel 4 ist klar ersichtlich, dass Cortisol als Stressparameter sehr häufig verwendet wird. Die Cortisolmessung im Blutplasma etablierte sich die letzten Jahrzehnte zu einer Standardmethode (Ellis et al., 2012). Durch die verzögerte Ausschüttung der Kortikosteroide ist es möglich Basalwerte zu bestimmen und somit Anstiege leichter zu erkennen. Außerdem ist die Blutabnahme eine recht einfache Technik und mit geschultem Personal eher risikoarm (Ellis et al., 2012). Weiters ist die Messung der Cortisolwerte anhand von RIA (Radioimmunoassay) und ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) sehr einfach und standardisiert durchzuführen, wodurch auch eine hohe Durchlaufquote erreicht werden kann (Ellis et al., 2012).

Jedoch stellt sich immer häufiger die Frage, ob Cortisol als berechtigter Indikator für Tierwohl verwendet werden kann. Denn bewertet man Tierwohl aus der funktionalen Sicht, so untersucht man, ob die Fische in ihrer Umgebung fähig sind, die damit auftretenden Bedingungen zu bewältigen (Huntingford et al., 2006). Ein Anstieg von Cortisol im Blut zeigt nur, dass die physiologische Stressantwort funktioniert, aber gibt keine Informationen darüber, ob der Fisch in der Lage ist mit dem Stress zurecht zu kommen oder nicht (Ellis et al., 2012; Huntingford et al., 2006).

Raposo De Magalhaes et al. (2018) kritisieren unter anderem auch, dass der Eingriff der Blutabnahme selbst, Stress verursacht und somit die Cortisollevel verzerrt sein können. Weiters ist die Stressantwort ein dynamischer Prozess und Messungen stellen nur einen kurzen Auszug davon dar (Raposo De Magalhães et al., 2018). Jedes Individuum reagiert mit unterschiedlich starker Cortisolausschüttung auf einen Stressor, da auch jedes Einzelne seine Umgebung anders wahrnimmt. Weiters spielen angeborene Prädispositionen und die Widerstandsfähigkeit der einzelnen Fische eine Rolle, wie sich diese gegenüber Stressereignissen verhalten (Raposo De Magalhães et al., 2018).

Bei der Cortisolmessung sind außerdem Altersphasen, Sexualzyklus und Rangordnung in der Gruppe zu berücksichtigen (Martinez-Porchas & Rafael Martinez-Cordova, 2009).

Ein weiterer sehr häufig verwendeter Stressparameter ist Glukose. Aber auch hier gibt es einige Kritikpunkte zur Aussagekraft.

Martinez-Porchas und Martinez-Cordova (2009) geben zu bedenken, dass der Ernährungszustand der Tiere eine große Rolle bei der Stressantwort und dem Abbau von Glukose spielt. Extrinsische Faktoren müssen bei der Messung der Glukoselevel berücksichtigt werden, da vor allem Futterzusammensetzung, Abstand zur letzten Fütterung und saisonale Schwankungen Auswirkungen auf den Glykogenspeicher der Leber haben (Martinez-Porchas & Rafael Martinez-Cordova, 2009). Auch wird von den Autoren eine schwache oder gar keine Veränderung des Plasmaglukosespiegels, auf einen hohen Energiebedarf während eines Stressors zurückgeführt. Um abnormale Ergebnisse möglichst zu verhindern, sollten Fische während der Akklimatisierungsphase vor jedem Experiment nicht unnötig gestresst werden, um einen Anstieg des Energiebedarfs zu vermeiden (Martinez-Porchas & Rafael Martinez-Cordova, 2009).

Alles in allem zeichnet sich ab, dass Cortisol und Glukose aufgrund ihrer hohen Variabilität möglicherweise nicht die zuverlässigsten Stressindikatoren sind, aber stets in Kombination mit anderen Parametern zur Untersuchung des Wohlergehens der Fische in Aquakulturen bei akut vorliegendem Stress, verwendet werden können (Raposo De Magalhães et al., 2018).

Eine solche Ergänzung von Stressparametern können durch nicht-invasive Messungen vorgenommen werden. Ein Prozess, welcher für Sexualhormone verwendet wurde, wurde adaptiert, um Cortisol und Cortisone in Wasserproben zu messen (Ellis et al., 2004). Es stellte sich heraus, dass auch diese Methoden ähnliche Werte liefern, wie Blutplasmaproben und somit könnte ein vorhergehender Stressor – die Blutabnahme selbst – vermieden werden. Jedoch wurden diese Messungen von Cortisol im Wasser nicht auf andere Stresshormone ausgeweitet und auch in fließendem Gewässer stellt sich die Probenahme erschwert dar (Ellis et al., 2004).

Weitere ergänzende, sehr leicht durchzuführende Messungen bzw. Stressindikatoren stellen Huntingford et al. (2006) in einer von ihnen zusammengeführten Tabelle dar. Sie beziehen sich auf direkt zu beobachtende Parameter, wie Farbänderungen der Haut oder Augen, erhöhte Atemfrequenz (zu erkennen an den Bewegungen der Kiemen), abnormale Schwimmbewegungen, Fluchtversuche, reduzierte Futteraufnahme, damit einhergehender

Konditionsverlust, minimale Wachstumsleistungen, Abnormitäten in der Entwicklung, Verletzungen inklusive Flossenschäden, Krankheitsstatus und abnehmende Reproduktionsrate (Huntingford et al., 2006).

Da speziell diese Stressparameter sehr unkompliziert für jeden zu erkennen sind, eignen sie sich gut in der Aquakultur, um durch einfache Kontrollen Stress bei den Fischen zu erkennen und zu vermeiden und so Tierwohl zu gewährleisten.

Wie bereits eingangs erwähnt, liegt der Unterschied von Kurzzeit- und Langzeitstress bei der Dauer der Aktivierung. Viele Autor:innen sehen daher auch Cortisolmessungen als ungeeignet, da die Freisetzung des Hormons mit der Dauer des Stressors abnimmt, weil das Nebennierengewebe der gestressten Fische weniger empfindlich auf die Wirkung von ACTH oder anderen Hypophysenhormonen reagiert (Ellis et al., 2004, 2012; Martinez-Porchas & Rafael Martinez-Cordova, 2009; Raposo De Magalhães et al., 2018). Weitere Untersuchungen bestätigen eine Gewöhnung des Organismus und somit eine reduzierte Stresshormonausschüttung bei gleichem Maß an Energie (Martinez-Porchas & Rafael Martinez-Cordova, 2009). Anders kann der Cortisolwert in chronisch gestressten Tieren über mehrere Wochen erhöht bleiben oder aber auch nach einer Woche auf Basalniveau zurückkehren. Wichtig ist bei der Interpretation des Tierwohls, die Gründe für diese unterschiedlich starke Sekretion zu untersuchen und zu berücksichtigen (Ellis et al., 2012).

Ein neuer Zugang sind hier Untersuchungen von oxidativem Stress, indem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gemessen werden. Diese werden vor allem nach einem chronischen Stressor vermehrt produziert und können Fette, Eiweiße, RNA und DNA schädigen (Sopinka et al., 2016). Diese kolorimetrischen Messungen sind jedoch sehr aufwendig und teuer und können in der Interpretation herausfordernd sein. Daher würde sich diese Methode zwar im Labor eignen, aber nicht in den kommerziellen Aquakulturen selbst (Sopinka et al., 2016).

Eine weitere bereits sehr gut untersuchte Labormethode ist die Sequenzierung von Hitzeschockproteinen (HSP). Diese sind sehr empfindlich gegenüber vielen Stressoren und können mit standardisierten, andererseits nur sehr aufwendigen Prozessen, analysiert werden (Sopinka et al., 2016).

Ein zusätzliches Feld der Stressforschung ist die Untersuchung der Auswirkungen von Stress bei Fischen auf die Produktqualität des Filets, wie pH-Wert, Farbe, Tropfwasserverlust, ATP im Muskel, sowie Glykogen im Muskel und Konsistenz (Concollato et al., 2019; Daskalova, 2019; Maria Poli, 2009). Die Autor:innen wünschen sich über ihre Erkenntnisse hinaus, weitere detaillierte Nachforschungen zu der Beziehung von Stress und dessen Einfluss auf die Fleischqualität von Fischfilets.

Abschließend bestätigen all diese wissenschaftlichen Publikationen und deren aufgezeigten Limitationen der derzeit häufig verwendeten Stressparameter, dass weitere Forschungsarbeit auf diesem Gebiet wünschenswert ist.

Viele der bekannten Methoden zur Messung von Stress sind hauptsächlich nur im Labor durchführbar. Es sind in Zukunft weitere Tests notwendig, um diese Methoden auch im kommerziellen Maßstab zu etablieren und für die Aquakulturbetreiber:innen zugänglich zu machen. Weiters sind Verhaltensbeobachtungen und regelmäßige Kontrollen unumgänglich. Das Wissen über das Verhalten und die Biologie der Fische soll umfassend bekannt sein und genutzt werden (Macaulay et al., 2021).

Nicht nur die Methoden sollen im kommerziellen Bereich ausgebaut werden, sondern auch die Bedingungen dieser gehören realitätsnaher gestaltet. Groß angelegte Studien mit angemessener Replikation von relevanten Besatzdichten in üblichen Hälterungsbecken, durchschnittliche Anzahl an Versuchstieren und damit einhergehende alltägliche Schlachtzahlen, sind erforderlich.

Zusätzlich soll ein Ausbau der Forschungen auf die Lernfähigkeit und Akklimatisierung der Fische angeregt werden. Ein weiterer Fortschritt im Verständnis der Bedeutung der Stressreaktion könnte sein, wenn akute oder chronische Stressparameter sicher mit einer verringerten Fitness oder anderen Veränderungen von Populationsmessgrößen in Verbindung gebracht werden (Sopinka et al., 2016). Es besteht der Bedarf, die Stressindikatoren mit Reproduktionsleistungen und Fitnessparameter zu verknüpfen.

Außerdem sind mittlerweile Studien bekannt, welche Cortisol aus Schuppen gemessen haben. Diese Einlagerungen von Stresshormonen in Schuppen zeigen großes Potenzial für zukünftige Biomarker. Solche neuen Messungen liegen unter anderem auch neuen Technologien zugrunde.

Zur Quantifizierung molekularer Reaktionen von Fischen, wurden Transkriptomik und Proteomik entdeckt. Diese Techniken können viele physiologischen Systeme gleichzeitig untersuchen, geben Aufschluss über Gen- und Proteinexpression bei ökologisch relevanten Ereignissen und können molekulare Veränderungen mit den jeweiligen Auslösern/ Stressoren verbinden. Viele Autor:innen befürworten daher die Weiterentwicklung und Verbreitung der Proteomik (Macaulay et al., 2021; Sopinka et al., 2016).

Zusammenfassend lässt sich nach intensiver Untersuchung der bisher verwendeten Stressparameter nun sagen, dass die zurzeit bekannten Publikationen durchaus berechtigte Studien durchführten. Jedoch wurde oft nicht zwischen akutem und chronischem Stress und den damit auftretenden Unterschieden in der Gen- und Hormonexpression und anderen Indikatoren geachtet.

Prinzipiell finden Blutplasmaparameter von Stresshormonen, wie Cortisol, Glukose, Laktat usw. bei akutem Stress Anwendung und in Verbindung mit Verhaltensbeobachtungen und dergleichen, sind diese auch aussagekräftig genug, um Stress bei Fischen zu bestätigen. Auch nicht-invasive Messungen lassen sich in Kombination mit Blutabnahme oder Verhaltensbeurteilungen für eine Einschätzung von Stressempfinden anwenden.

Hingegen ist eine aussagekräftige Beurteilung von chronischem Stress, anhand von Cortisol- und Glukosewerten, schwierig. Wie bereits erwähnt können diese Stressparameter stark variieren und die Expression ist von Geno- und Phänotypen der einzelnen Fische anhängig. Daher soll speziell in diesem Bereich auf andere Methoden zur Messung von Stress zurückgegriffen werden. Insbesondere die Messung von ROS und HSP bietet hier eine grundlegende Chance, wenn diese auch für die kommerzielle Aquakultur etabliert wird.

Weiters liegt sehr viel Potenzial in der Proteomik, welche zukünftig noch intensiver untersucht werden soll und verschiedene Produktionsschritte der Speisefischzucht mit den molekularen Ebenen der Stressantwort verbinden soll.

Generell soll eine Beurteilung des Stressempfindens der Fische so einfach wie möglich zugänglich gemacht werden, um es in der tagtäglichen Arbeit integrieren zu können und so das Wohlergehen der Tiere über ihr Leben hinaus zu gewährleisten.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war es, die vorliegenden Publikationen zur Stressforschung zu erfassen und zu evaluieren, ob dieselben Stressparameter bei Hälterung und Schlachtung Anwendung finden. Da davon ausgegangen wurde, dass dieselben biochemischen Grundlagen der Stressantwort bei Kurzzeit- und Langzeitstress vorliegen.

Hierfür wurde eine Literaturrecherche auf Pubmed und Google Scholar durchgeführt. Weiters wurden auch einige Artikel über die wissenschaftliche Plattform Researchgate beschafft. Gesucht wurde nach Forschungsarbeiten der letzten 15 Jahre.

Der häufigste verwendete Stressparameter in der Literatur war ein erhöhter Cortisolwert im Blutplasma. Dies zeigte sich in Kombination mit anderen veränderten Blutwerten oder Verhaltensbeobachtungen als aussagekräftiger Indikator für akuten Stress. Akuter Stress wurde durch unterschiedlichstes „Handling“ oder verschiedene Betäubungsmethoden ausgelöst. Hingegen für Langzeitstress bzw. chronischen Stress bei der Hälterung erwies sich Cortisol als unzuverlässig, da die Fische durch Stoffwechsellanpassungen, aufgrund von Futterentzug, in einen anaeroben Zustand wechseln können und so Stressreaktionen blockiert werden können. Zur Beurteilung von chronischem Stress wurden neue Methoden, wie die Proteomik, untersucht. Proteine spielen eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen und somit konnten schon einige als potenzielle Marker für die Messung von Stresszuständen dienen.

Die vorher aufgestellte Hypothese konnte widerlegt werden, da zwar dieselben biochemischen Grundlagen der Stressantwort vorliegen, aber nicht dieselben Stressparameter für Kurzzeit- und Langzeitstress angewendet werden können.

## 6. Summary

The aim of this diploma thesis was to survey the available publications on stress research and to evaluate whether the same stress parameters are applied in caging and slaughtering. Since it was assumed that the same biochemical bases of stress response are present in short term and long term stress.

For this purpose, a literature search was performed on Pubmed and Google Scholar. Furthermore, some articles were also obtained via the scientific platform Researchgate. Research papers from the last 15 years were searched.

The most commonly used stress parameter in the literature was elevated blood plasma cortisol level. This, in combination with other altered blood values or behavioral observations, was shown to be a meaningful indicator of acute stress. Acute stress was induced by various "handling" or anesthetic methods. In contrast, for long-term stress or chronic stress during caging, cortisol proved to be unreliable, as fish can switch to an anaerobic state due to metabolic adaptations caused by food deprivation, thus blocking stress responses. New methods, such as proteomics, have been investigated to assess chronic stress. Proteins play an important role in physiological processes and thus some could already serve as potential markers for measuring stress.

The hypothesis put forward previously could be disproved, because although the same biochemical basis of the stress response is present, the same stress parameters cannot be applied to short-term and long-term stress.

## Literaturverzeichnis

- Barton, B. A. (2002). *Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids I* (Bd. 42). <https://academic.oup.com/icb/article/42/3/517/723932>
- Bermejo-Poza, R., Fernández-Muela, M., De la Fuente, J., Pérez, C., de Chavarri, E. G., Díaz, M. T., Torrent, F., & Villarroel, M. (2019). Physio-metabolic response of rainbow trout during prolonged food deprivation before slaughter. *Fish Physiology and Biochemistry*, *45*(1), 253–265. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0559-0>
- Brijs, J., Sundell, E., Hjelmstedt, P., Berg, C., Senčić, I., Sandblom, E., Axelsson, M., Lines, J., Bouwsema, J., Ellis, M., Saxer, A., & Gräns, A. (2021). Humane slaughter of African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*): Effects of various stunning methods on brain function. *Aquaculture*, *531*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735887>
- Carbajal, A., Reyes-López, F. E., Tallo-Parra, O., Lopez-Bejar, M., & Tort, L. (2019). Comparative assessment of cortisol in plasma, skin mucus and scales as a measure of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis activity in fish. *Aquaculture*, *506*, 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.005>
- Concollato, A., Dalle Zotte, A., Vargas, S. C., Cullere, M., Secci, G., & Parisi, G. (2019). Effects of three different stunning/slaughtering methods on physical, chemical, and sensory changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(2), 613–619. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9222>
- Daskalova, A. (2019). Farmed fish welfare: stress, post-mortem muscle metabolism, and stress-related meat quality changes. In *International Aquatic Research* (Bd. 11, Nummer 2, S. 113–124). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s40071-019-0230-0>
- Daskalova, A., Pavlov, A., Kyuchukova, R., & Daskalov, H. (2016). Humane slaughter of carp – A comparison between three stunning procedures. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *16*(4), 753–758. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v16\\_4\\_01](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v16_4_01)
- Eissa, N., Wang, H. P., Yao, H., Shen, Z. G., Shaheen, A. A., & Abou-ElGheit, E. N. (2017). Expression of Hsp70, Igf1, and three oxidative stress biomarkers in response to handling and salt treatment at different water temperatures in yellow perch, *Perca flavescens*. *Frontiers in Physiology*, *8*(SEP). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00683>

- Ellis, T., James, J. D., Stewart ‡ A N, C., & Scott, D. A. P. (2004). A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *Journal of Fish Biology* (2004) 65, 1233–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2004.00499.x>
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., & Martins, C. I. M. (2012). Cortisol and finfish welfare. In *Fish Physiology and Biochemistry* (Bd. 38, Nummer 1, S. 163–188). <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9568-y>
- Gaffney, L. P., & Lavery, J. M. (2022). Research Before Policy: Identifying Gaps in Salmonid Welfare Research That Require Further Study to Inform Evidence-Based Aquaculture Guidelines in Canada. In *Frontiers in Veterinary Science* (Bd. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.768558>
- Gräns, A., Niklasson, L., Sandblom, E., Sundell, K., Algers, B., Berg, C., Lundh, T., Axelsson, M., Sundh, H., & Kiessling, A. (2015). Stunning fish with CO<sub>2</sub> or electricity: Contradictory results on behavioural and physiological stress responses. *Animal*, 10(2), 294–301. <https://doi.org/10.1017/S1751731115000750>
- Håstein, T., Scarfe, A. D., & Lund, V. L. (2005). Science-based assessment of welfare: Aquatic animals. In *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* (Bd. 24, Nummer 2). <https://www.researchgate.net/publication/7410810>
- Hoem, K. S., & Tveten, A. K. (2020). Current approaches in decoding the molecular mechanisms of long-term stress in adult farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). In *Reviews in Aquaculture* (Bd. 12, Nummer 3, S. 1708–1720). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12405>
- Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandøe † A N, P., & Turnbull, D. J. F. (2006). *Current issues in fish welfare*. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2005.01046.x>
- Kumar, P., Abubakar, A. A., Sazili, A. Q., Kaka, U., & Goh, Y. M. (2022). Application of Electroencephalography in Preslaughter Management: A Review. In *Animals* (Bd. 12, Nummer 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani12202857>
- Lambooij, B., Bracke, M., Reimert, H., Foss, A., Imsland, A., & van de Vis, H. (2015). Electrophysiological and behavioural responses of turbot (*Scophthalmus maximus*) cooled in ice water. *Physiology and Behavior*, 149, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.05.019>
- Lines, J. A., & Spence, J. (2014). Humane harvesting and slaughter of farmed fish. In *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* (Bd. 33, Nummer 1).

- Macaulay, G., Bui, S., Oppedal, F., & Dempster, T. (2021). Challenges and benefits of applying fish behaviour to improve production and welfare in industrial aquaculture. In *Reviews in Aquaculture* (Bd. 13, Nummer 2, S. 934–948). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/raq.12505>
- Maria Poli, B. (2009). Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality. *Italian Journal of Animal Science*, 8(sup1), 139–160. <https://doi.org/10.4081/ijas.2009.s1.139>
- Martinez-Porchas, M., & Rafael Martinez-Cordova, L. (2009). *Cortisol and Glucose: Reliable Indicators of fish stress?* <https://www.researchgate.net/publication/237165581>
- Naderi, M., Keyvanshokoh, S., Salati, A. P., & Ghaedi, A. (2017). Effects of chronic high stocking density on liver proteome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(5), 1373–1385. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0378-8>
- Pankhurst, N. W. (2011). *The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective*.
- Petitjean, Q., Jean, S., Gandar, A., Côte, J., Laffaille, P., & Jacquin, L. (2019). Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. In *Science of the Total Environment* (Bd. 684, S. 371–380). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.357>
- Poli, B. M., Parisi, G., Scappini, F., & Zampacavallo, G. (2004). *Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management*.
- Raposo de Magalhães, C. S. F., Cerqueira, M. A. C., Schrama, D., Moreira, M. J. V., Boonanuntanasarn, S., & Rodrigues, P. M. L. (2018). A Proteomics and other Omics approach in the context of farmed fish welfare and biomarker discovery. In *Reviews in Aquaculture* (Bd. 12, Nummer 1, S. 122–144). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12308>
- Raposo De Magalhães, C., Schrama, D., Farinha, A. P., Revets, D., Kuehn, A., Planchon, S., Rodrigues, P. M., & Cerqueira, M. (2020). Protein changes as robust signatures of fish chronic stress: A proteomics approach to fish welfare research. *BMC Genomics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6728-4>
- Retter, K., Esser, K. H., Lüpke, M., Hellmann, J., Steinhagen, D., & Jung-Schroers, V. (2018). Stunning of common carp: Results from a field and a laboratory study. *BMC Veterinary Research*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1530-0>

- Robb, D. H. F., Wotton, S. B., McKinstry, J. L., Sørensen, N. K., & Kestin, S. C. (2000). Commercial slaughter methods used on Atlantic salmon: Determination of the onset of brain failure by electroencephalography. *Veterinary Record*, *147*(11), 298–303. <https://doi.org/10.1136/vr.147.11.298>
- Rodrigues, P. M., Silva, T. S., Dias, J., & Jessen, F. (2012). PROTEOMICS in aquaculture: Applications and trends. In *Journal of Proteomics* (Bd. 75, Nummer 14, S. 4325–4345). <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.042>
- Sopinka, N. M., Donaldson, M. R., O'Connor, C. M., Suski, C. D., & Cooke, S. J. (2016). Stress Indicators in Fish. In *Fish Physiology* (Bd. 35, S. 405–462). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00011-4>
- van de Nieuwegiessen, P. G., Boerlage, A. S., Verreth, J. A. J., & Schrama, J. W. (2008). Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. *Applied Animal Behaviour Science*, *115*(3–4), 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.05.008>
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). *The Stress Response in Fish* (Bd. 77, Nummer 3). <http://hdl.handle.net/2066/16774>
- Zahedi, S., Akbarzadeh, A., Mehrzad, J., Noori, A., & Harsij, M. (2019). Effect of stocking density on growth performance, plasma biochemistry and muscle gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *498*, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.044>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Übersicht der Ebenen der Stressantwort beim Fisch.

Abbildung 2: Tierschutz-Schlachtverordnung Anhang B Teil 1.

Abbildung 3: Tierschutz-Schlachtverordnung Anhang B Teil 2.

Abbildung 4: Graphische Darstellung des Auswahlverfahrens zur gefundenen Literatur auf Pubmed.

Abbildung 5: Graphische Darstellung des Auswahlverfahrens zur gefundenen Literatur auf Google Scholar.

Abbildung 6: Zuordnung der gemessenen Stressparameter zu den drei Ebenen der Stressantwort der Fische.

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Darstellung der in Österreich gängigen Betäubungsverfahren anhand der Leitlinie für eine gute Hygienepraxis für die Schlachtung und Verarbeitung von Fischen aus Wildfang oder eigener Aquakultur. Herausgegeben vom Bundesministerium für Gesundheit, 2012.

Tabelle 2: Auflistung der in der Literatur verwendeten Stressor/ -en mit den dazu gemessenen Stressparameter.