

PD Dr. Ulf Bickmeyer und Dr. Torsten Fregin
Alfred Wegener Institut, Helmholtz Zentrum für
Polar- und Meeresforschung, Am Handelshafen 12,
27570 Bremerhaven

28.2.2015

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Referat 314
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn

AZ 314-06.01-2812HS009

**„Vergleichende Untersuchungen zur tiergerechten Betäubung oder Tötung von
Krustentieren“**

Laufzeit: 1.10.2012 -28.2.2015

Inhaltsverzeichnis

Laut Arbeitsplan geplante Arbeitsschritte während des abgelaufenen Berichtszeitraums	3
Tatsächlich durchgeführte Arbeitsschritte und erreichte Ziele	3
Vergleich des Vorhabenstandes mit dem verbindlichen Arbeits- und Zeitplan	3
Vergleich der verwendeten Mittel mit dem verbindlichen Finanzierungsplan	3

Zusammenfassende Beurteilung unterschiedlicher Betäubungsmethoden ...4

Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse in Bezug zur Tierschutz- Schlachtverordnung.....4

I. Experimenteller Teil

Ia Versuchsaufbau und Vorversuche 1.10.2012 – 31.3.2013	5
Zusammenfassung Ia	12

Ib Herabkühlen, CO ₂ Behandlung, MgCl ₂ Behandlung, Wärme- und Elektrobehandlung mit dem LAVES Elektrobetäubungsgerät 1.4.2013 – 31.3.2014.....	13
Fazit und Zusammenfassung Ib	30

Ic Verwendung des kommerziellen Gerätes Crustastun™ zur Elektrobetäubung/- tötung von Krebsen 1.4.2014 – 31.12.2015.....	38
Fazit und Zusammenfassung Ic.....	55

II. Diskussion zu den Ergebnissen dieses Projekts und Stellungnahme zu den verwendeten Betäubungs- und Tötungsverfahren in Bezug zur Tierschutz-Schlachtverordnung.....66

Stellungnahme hinsichtlich der Eignung und der derzeit und bereits Untersuchten Betäubungsmethoden	67
Stellungnahme zur Tierschutz-Schlachtverordnung	71
Literaturverzeichnis der Publikationen zum Thema (Stand 25.2.2015)	74

Laut Arbeitsplan geplante Arbeitsschritte während des abgelaufenen Berichtszeitraums

Bis 31.12 2012: Versuchsaufbau, Testmessungen (*Astacus*) und erste Messungen am juvenilen Hummer.

Bis Juni 2013 Kontrollen und Elektrobetäubung sowie Betäubung durch kühlen.

Bis 31.3. 2014 Betäubungsversuche mittels Abkühlung, $MgCl_2$, CO_2 und elektrischen Strom (LAVES Gerät) am Hummer.

Bis 31.12 2014 Versuche zur Elektrobetäubung mit dem kommerziellen Gerät Crustastun

Bis 28.2.2014 Stellungnahme zu den Betäubungsverfahren und zum Kochvorgang

Tatsächlich durchgeführte Arbeitsschritte und erreichte Ziele

Alle Arbeitsschritte wurden planungsgemäß durchgeführt.

Vergleich des Vorhabenstandes mit dem verbindlichen Arbeits- und Zeitplan

Der Arbeits- und Zeitplan wurde eingehalten .

Vergleich der verwendeten Mittel mit dem verbindlichen Finanzierungsplan

„Erläuterungen der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises zur Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit“:

Wir befinden uns innerhalb des geplanten finanziellen Aufwands der durchgeführten Experimente.

Zusammenfassende Beurteilung unterschiedlicher Betäubungsmethoden

Als eingeschränkt wirksame Betäubungsmethode ist CO₂ Einleitung in das Hälterungswasser einzustufen, obwohl der pH Wert des Wassers auf ~pH5 (Stress) abfällt und die Zeit der Applikation zur wirksamen Betäubung bis zu einer Stunde beträgt.

Lagerung auf Süßwassereis verlangsamt nur alle Prozesse ist jedoch nicht wirksam. Lagerung auf Seewassereis führt über kurz oder lang zum Tod der Tiere und ist damit ein Tötungsverfahren.

MgCl₂ ist bei fast allen Meerestieren wirksam aber nicht bei decapoden Krebsen (hier Hummern).

Elektrobehandlung führt bei Hummern zu rhythmischen (epileptischen) Entladungen im zentralen Nervensystem, welche jedoch eine Reizdiskriminierung der Tiere über einen Zeitraum von einigen Minuten größtenteils überlagert. Flusskrebse zeigen seltener spontane rhythmische Entladungen im zentralen Nervensystem, hier scheint die Elektrobehandlung wirksam zu sein.

Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse in Bezug zur Tierschutz-Schlachtverordnung

Dekapode Krebse zeigen bei langsamer Erwärmung (1°C/min) keine ungewöhnlichen Zeichen großer Erregung bis das Nervensystem bei ~ 30°C Wassertemperatur keine Aktivität mehr, auch auf äußere Reize hin, ausbildet. Die Tiere zeigen kein Fluchtverhalten. Bei direkter/schneller Gabe in kochendes Wasser zeigen Hummer und Flusskrebse während unserer Experimente kein typisches Fluchtverhalten wie etwa den Schwanzfächerschlag und sie verhalten sich auch sonst ruhig. Im zentralen Nervensystem ist jedoch sehr starke Aktivität zu verzeichnen. Diese starke Aktivität ließ sich durch die genannten Betäubungsverfahren nicht unterdrücken, außer dass nach Elektrobehandlung eine Überlagerung mit der „epileptischen“ Aktivität stattfand. Während der „epileptischen“ Aktivität erscheinen die Tiere phänotypisch als tot. Zur Elektrobehandlung werden die Tiere in ein Becken mit vom Normalzustand abweichendem Salzgehalt (Stress) gebracht und über zwei Elektroden von Strom durchflossen. Ob diese Behandlung einer schnelleren Behandlung durch direkte Gabe in heißes Wasser vorzuziehen ist, bleibt zu bezweifeln.

I. Experimenteller Teil.

1a. Wichtige Ergebnisse und andere wesentliche Ereignisse des **Berichtszeitraums 1.10.2012 – 31.3.2013**

Entwicklung einer Präparationstechnik mit Ableitelektrodenimplantation

In den meisten wissenschaftlichen Experimenten am Krebsnervensystem werden semiintakte Tiere, bei denen ein Großteil der Kutikula entfernt wurde, oder auch nur einzelne Teile des Nervensystems, die aus den Tieren komplett herausgeschnitten wurden, verwendet. Diese Methoden sind für die Aufgabenstellung ungeeignet. Der Krebspanzer stellt eine Barriere dar, die das Innere des Tieres gegen Umwelteinflüsse abschirmt. Insbesondere der Anstieg der Temperatur im Inneren des Tieres wird durch den Panzer verzögert. Diese Tatsache ist sehr wichtig für die aktuellen Untersuchungen, weswegen auf eine möglichst geringe Beschädigung der Körperoberfläche der Tiere bei der Implantation der Messelektroden geachtet wurde. Um den thermalen Einfluss der Operationswunde möglichst gering zu halten, wird sie mit Silikonkautschuk, Gewebekleber sowie Acrykleber versiegelt. Da die Ableitelektrodenröhre aus Metall bestehen und damit gute Wärmeleiter darstellen, wird der letzte Teil vor Eintritt in das Tier ebenfalls mit Silikonkautschuk beschichtet.

Besonderen Zeitaufwand benötigte die Verbesserung der Elektroden um klare Signale aufzeichnen zu können. Entgegen der geplanten Verwendung von käuflichen Elektroden erwiesen sich selbstgefertigte mit Teflon beschichtete Hakenelektroden, die teilweise mit Kunstharz beschichtet wurden, als deutlich überlegen. Zur Ableitung von extrazellulären Potentialen werden die selbstgefertigten Hakenelektroden (meist als Doppelhakenelektrode, also zwei Hakenelektroden nebeneinander) verwendet. Als gutes Material für die Elektroden haben sich teflonbeschichtete Edelstahlröhre mit einem Durchmesser von 75 µm (ohne Beschichtung) erwiesen. Sie tragen zu einem guten Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei, sind preiswert und stabil genug um ein Konnektiv aus der Körperhöhle und damit der Hämolymphe zu heben. Sie sind für die Bearbeitung der Fragestellung im Vergleich zu anderen Materialien (Silber, Kupfer, Wolfram in verschiedenen Dicken) ohne Einschränkung geeignet.

Diese Elektroden können auch implantiert werden und nach Wundverschluss mit Gewebekleber über mehrere Stunden bis zu Tagen verwendet werden. Es wurden zehn Krebse der Gattung *Astacus* verwendet um den Messplatz zu optimieren. Gleichzeitig konnten die dabei erhobenen Daten zur Reizweiterleitung beim kühlen und erhitzen ausgewertet werden. Bisher wurden Experimente an elf Hummer der Gattung *Homarus* bezüglich Kälte- und Hitzebetäubung/Tötung durchgeführt. Beim Flusskrebs *Astacus* wird die Signalweiterleitung bei 0° im Eis reduziert, sie ist jedoch nicht völlig unterbunden. Bei etwa 30-35°C hört die Reizweiterleitung während des Erhitzens auf, d.h. das Tier ist vollständig betäubt oder bereits tot ist. Der Hummer verträgt die Haltung in gefrierendem Seewasser (-1.8°C) augenscheinlich nicht lange (>45 min), während er Temperaturen um die 0°C toleriert und die Reizweiterleitung währenddessen weitgehend unterdrückt ist. Ebenso wird die Reizweiterleitung innerhalb von 10-20 s durch Erhitzung unterbrochen (beim juvenilen Hummer). Die Tiere wurden in einen Kochtopf mit heißem Wasser (>95°C) gesetzt, während mit implantierten Elektroden sowohl elektrische Reize gesetzt als auch Reizantworten aufgezeichnet wurden. Dies bedeutet, dass innerhalb weniger Sekunden die Reizweiterleitung und damit die Signalübertragung der Sinnesorgane ans Zentralnervensystem unterbrochen sind.

Die Hakenelektrode wird durch eine Öffnung in der Körperoberfläche des Krebses seitlich neben einem der Konnektive abgesenkt, unter das Konnektiv bewegt und

dann nach oben gezogen. Im günstigsten Fall hängt das Konnektiv über dem Haken, ohne dass Teile der Epidermis oder Muskeln stören. Elektrode und Konnektiv werden vorsichtig mit Zellstoff abgetupft um anhaftende Hämolymphe zu entfernen. Für eine gute Ableitung ist es essentiell, dass einerseits möglichst wenig Flüssigkeit anhaftet und es andererseits nicht zu einem Kurzschluss mit der Erdungselektrode kommen kann. In dieser „semiintakten“ Präparation kann schon überprüft werden, ob die Elektroden gut sitzen und funktionieren. Anschließend werden Elektrode und Konnektiv von Silikonkautschuk umgossen. Dafür wird ein spezieller Zweikomponentenkautschuk (Kwik-Cast, WPI) verwendet, der keine giftigen Substanzen bildet und bei Raumtemperatur in wenigen Minuten aushärtet. Bei auf Eis immobilisierten bzw. paralysierten Tieren ist es nötig über einen Schlauch Luft mit Raumtemperatur auf das Silikon zu pumpen, da es sonst nicht aushärtet. Nach Aushärtung wird das Konnektiv wieder in den Körper zurück abgesenkt, die Öffnung mit Gewebekleber und gegebenenfalls weiterem Silikonkautschuk und Acrylkleber versiegelt.

Es wurden drei verschiedene Orte für Ableitungen untersucht: die Schlundkonnektive, die Konnektive der Thorakalganglien, sowie die Konnektive der Abdominalganglien.

Die Schlundkonnektive stellen im Prinzip den geeignetsten Ableitort dar. Sie stellen direkte Ein- und Ausgänge des Oberschlundganglions, dem höchsten Integrationszentrum im Krebsnervensystem, dar. Sie ziehen relativ weit im Inneren des Tieres gelegen aus der Kopfkapsel in den Thorax und umrunden beiderseitig lateral den Schlund. Der Präparationserfolg ist vergleichsweise niedrig.

Ableitungen der Abdominalganglien sind gegenüber Ableitungen der Schlundkonnektive und der thorakalen Konnektive relativ einfach und robust und wurden deswegen favorisiert.

Elektrische und mechanische Reizung

Drei verschiedene Reizmethoden werden in den Versuchen eingesetzt. Zur Reizung an den 1. Antennen werden Silberdrähte (250 µm) verwendet, die in Schlaufen um die Basalglieder der Antennen gewickelt werden. Diese Reizelektroden liegen also außerhalb des Tieres. Zur Reizung am Telson werden zwei Metallelektroden (feine Edelstahlnadeln) links und rechts der Medianlinie in das Telson eingestochen und verklebt. Sie lassen sich gegebenenfalls auch als Aufzeichnungselektroden verwenden. Als Stimulator kommt ein SD9 (Grass) zur Anwendung, der über einen Funktionsgenerator moduliert werden kann. Zur Reizaufzeichnung geht eine Verbindung vom Funktionsgenerator zum AD-Wandler. Die Reizspannung wird jeweils individuell eingestellt. Kriterium ist eine direkte zeitlich gekoppelte Antwort des Nervensystems auf den Reiz.

Zur mechanischen Reizung im Kopf- und Schwanzbereich wird ein Kunststoffstab verwendet, mit dem das Tier einige Sekunden in der jeweiligen Körperregion berührt wird.

Signalaufzeichnung und Analyse

Temperaturen jenseits der 42°C sind bei neurobiologischen Fragestellungen ungewöhnlich. Die routinemäßig verwendeten Materialien und Geräte sind in den meisten Fällen nicht für höhere Temperaturen ausgelegt. So funktionieren vorhandene Temperaturkontroller nur bis 50°C, häufig sind Kabel bis maximal 60°C ausgelegt. Viele Isoliermaterialien funktionieren nur bis 60°C/ 96°C, und wie Metallelektroden auf solche Temperaturunterschiede reagieren, ist auch kaum untersucht. Die starken Schwankungen, die in den Messsignalen nach Überführung der Tiere in kochendes Wasser auftreten, könnten sehr verschiedene Ursachen

haben wie z. B. thermisch hervorgerufene Änderungen des Gewebes, welches mechanisch induzierte Reizartefakte produziert (s. Abb. 5).

Ob sich in dieser Situation noch Signale des Nervensystems trennen lassen von generell auftretenden Spannungen durch mechanische Beanspruchung des Gewebes und der Kutikula, Zersetzung von Molekülen, Zusammenbruch von Zellmembranen u.a., wird aktuell mittels schnellen Fouriertransformation (FFT) ein Powerspektrum der Nervenzellableitungen erstellt und dieses untersucht. Diese mathematische Methode gibt Einblicke in das Antwortverhalten einer großen Summe von Potentialen, so wie sie im Zentralnervensystem der Krebse gemessen werden können. Mittels der FFT lassen sich die Nervensignale sehr gut untereinander vergleichen und erlauben möglicherweise auch Aussagen über den allgemeinen Erregungszustand der Krebse.

In den gemessenen Antworten auf Stimulation sind jeweils sensorische afferente als auch efferente Signale enthalten. Die FFT erzeugt ein Spektrogramm, welches die unterschiedlichen Frequenzgehalte innerhalb eines Signals und ihre dazugehörigen Stärke angibt (Powerspektrum).

Folgend sind Abbildungen und Ableitungen einiger Experimente dargestellt.

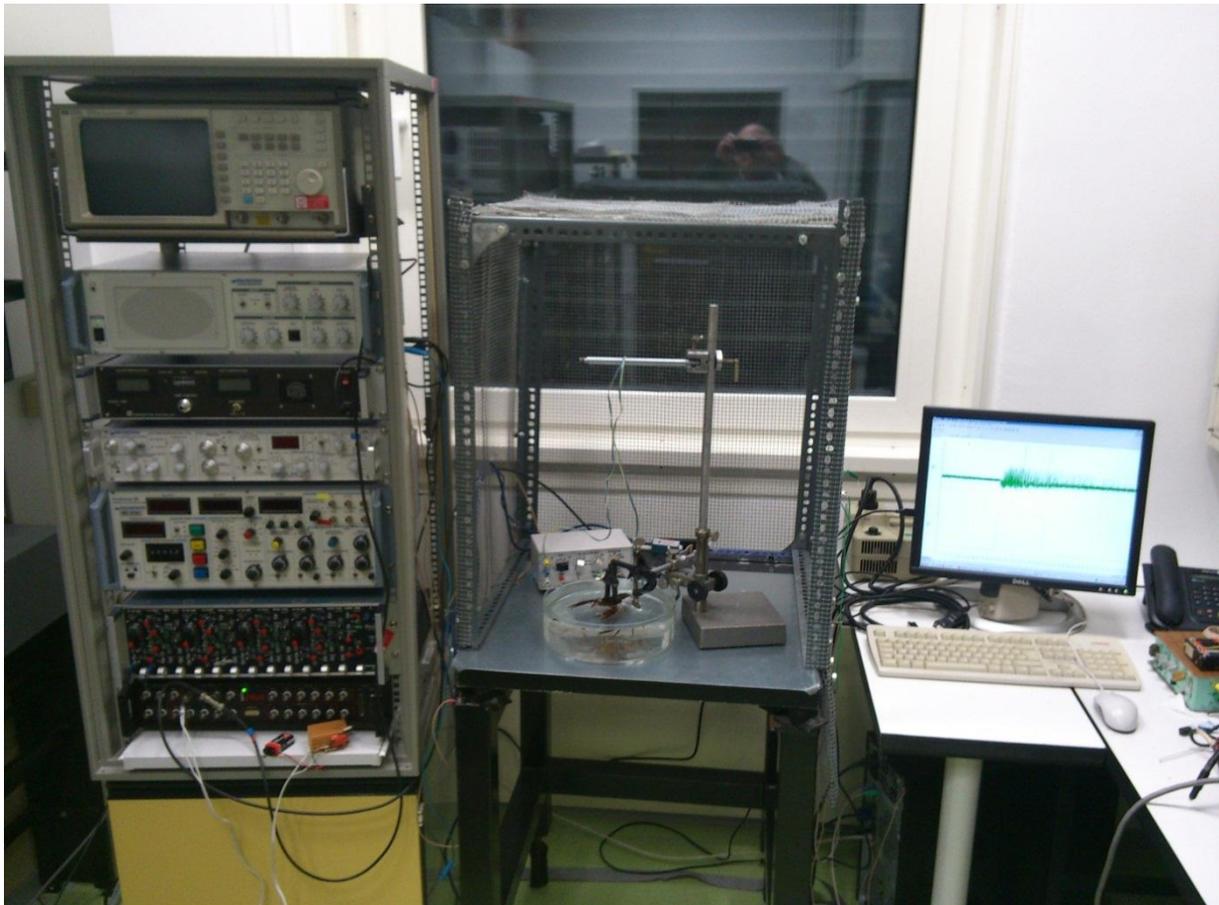


Abb. 1. Aufbau und Anordnung der Versuchsanlage. Der Wasserbehälter wird je nach Bedarf in Größe und Beschaffenheit variiert.

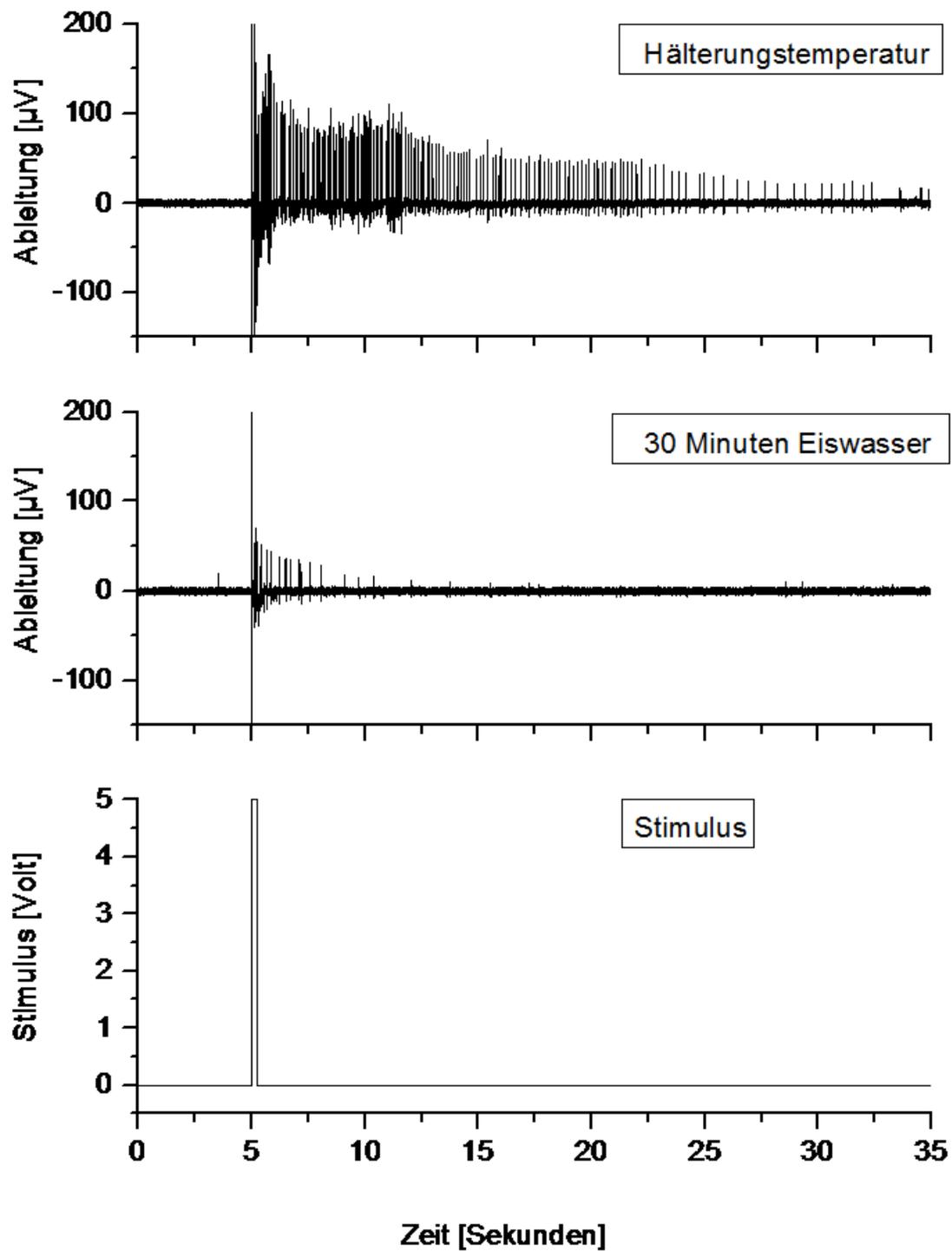


Abb. 2. Reizantworten (Nervenimpulse) auf einen elektrischen Stimulus bei Hälterungstemperatur und nach 30 min in Eiswasser (*Astacus astacus*).

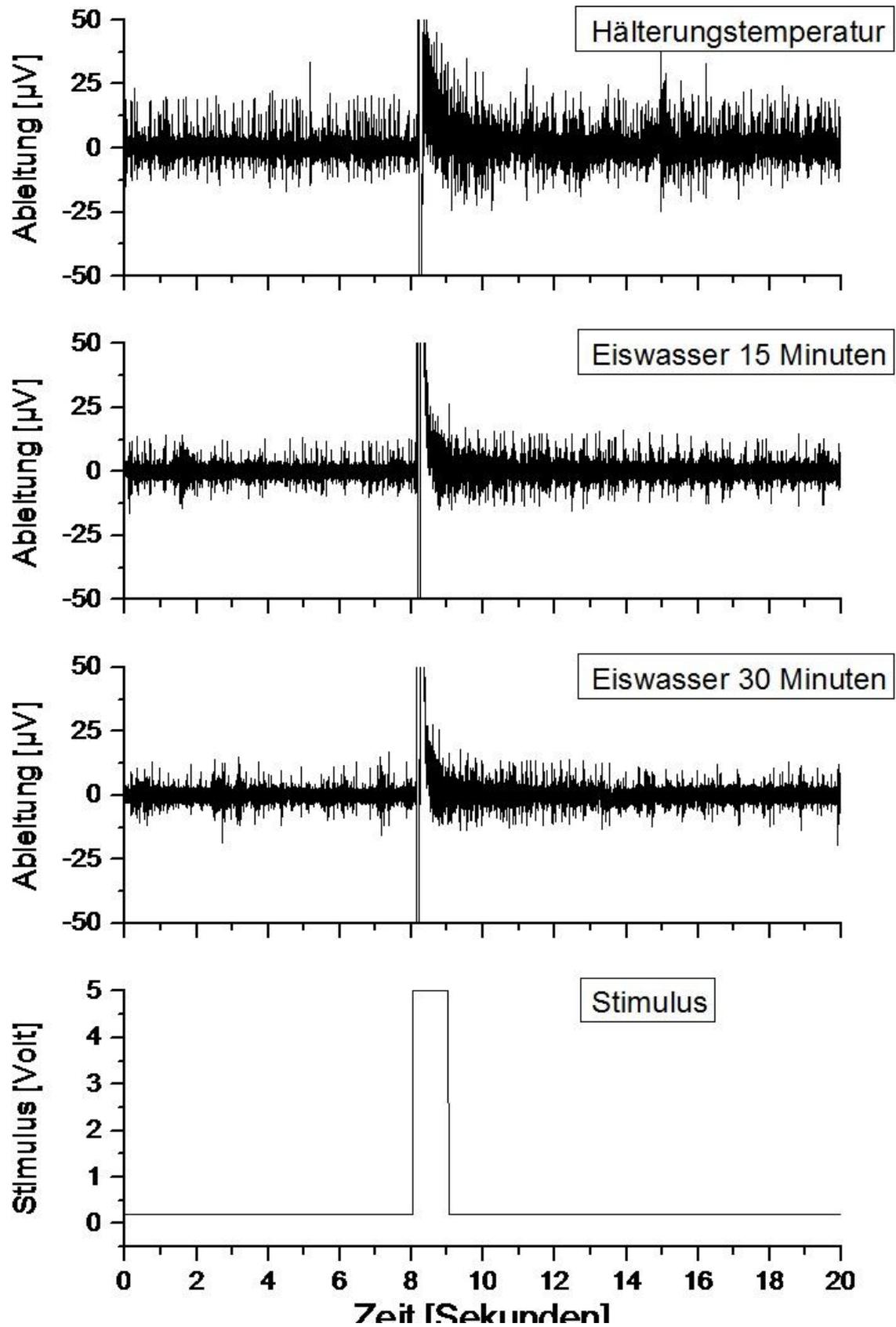


Abb. 3. Reizantworten (Nervenimpulse) auf einen elektrischen Stimulus bei Hälterungstemperatur und nach 15 und 30 min in Eiswasser bei (*Homarus gammarus*).

Die Fast Fourier Transformation der abgeleiteten und in Abb. 3 dargestellten Signale erlaubt auch die Detektion auch relativ kleiner Änderungen der Potentialfolgen im Nerv (Abb. 4).

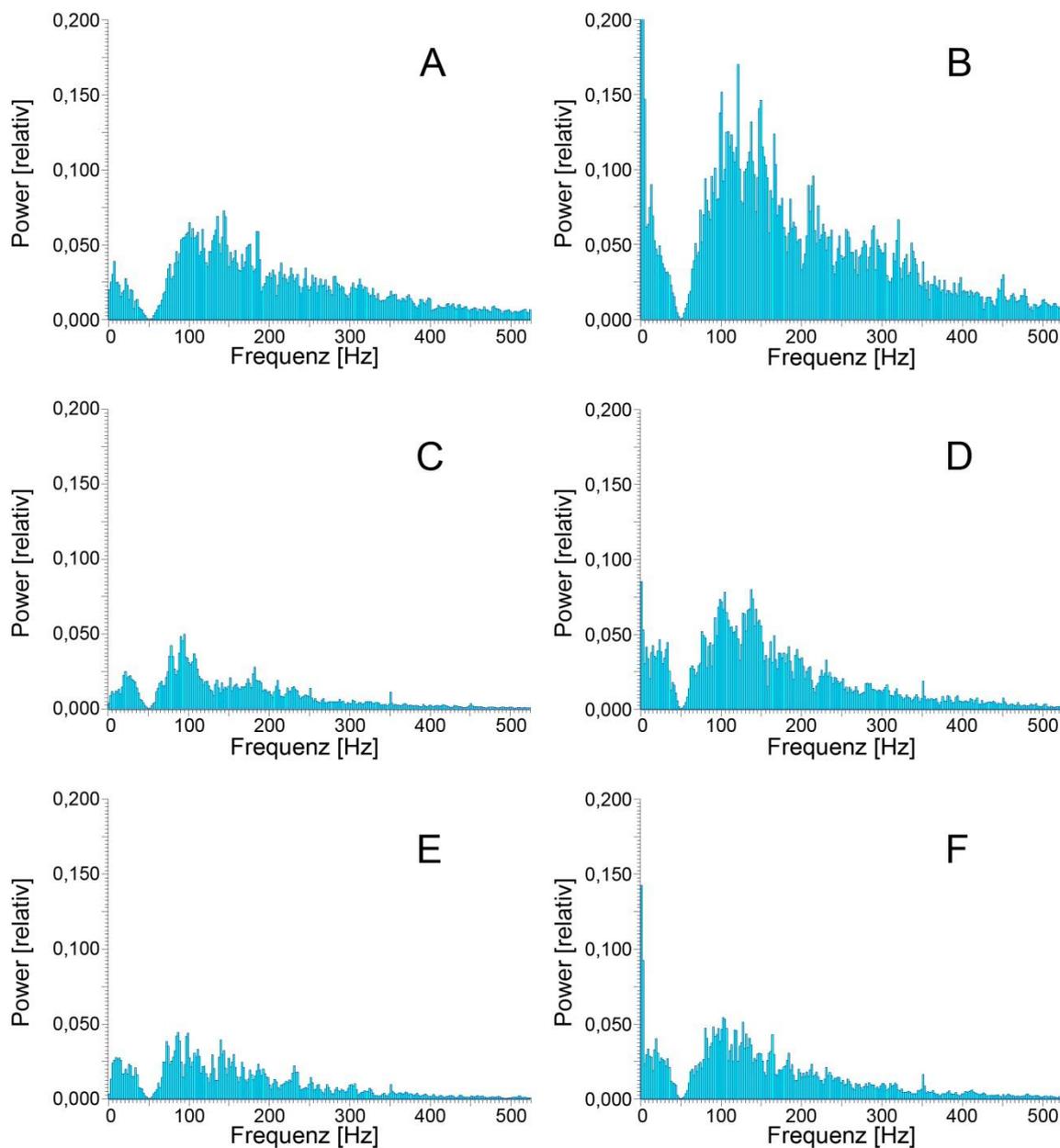


Abb. 4. A, C, E zeigen die Grundaktivität des Nervs bei Hälterungstemperatur (A) nach 15 min in Eiswasser (C) und nach 30 min in Eiswasser (E). B, D, F, zeigen die Reizantwort auf den jeweiligen Stimulus bei Hälterungstemperatur (B) nach 15 min in Eiswasser (D) und nach 30 min in Eiswasser (F). Die FFT erlaubt als Powerspektrum eine Darstellung der Amplituden der jeweiligen Frequenzanteile. Auch nach 30 min in Eiswasser zeigt das Spektrum noch eine leicht erhöhte Reizantwort (F gegenüber E).

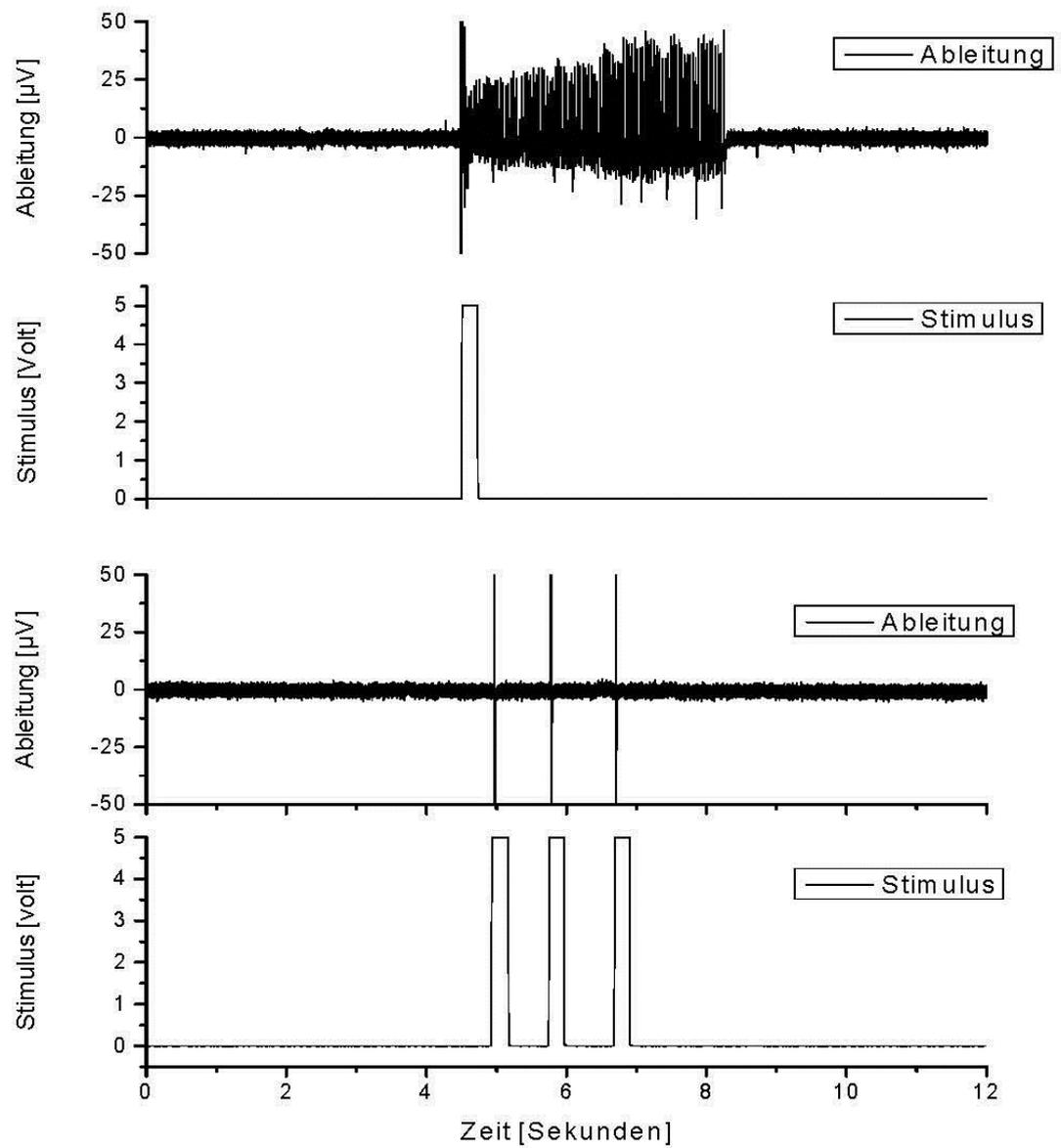


Abb. 5. Oben: Reiz-Reaktion des *Astacus* bei Raumtemperatur
 Unten: nach 1 min in heißem Wasser (100°C).

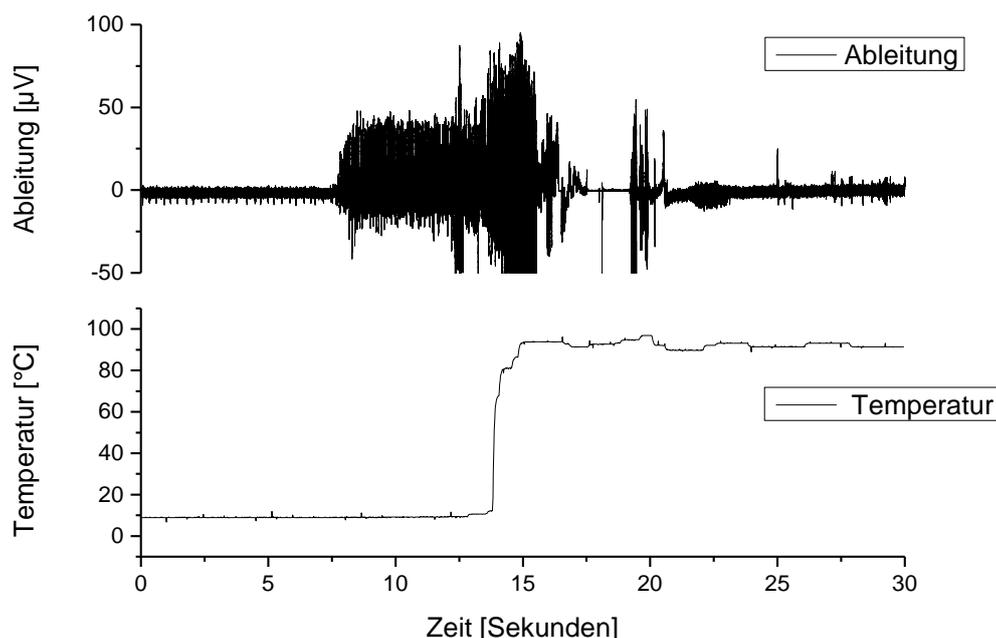


Abb. 6. Überführung eines *Astacus astacus* von Hälterungstemperatur in heißes Wasser. Erhöhte Aktivität durch mechanische Stimulation während des Umsetzens gefolgt von einem Burst ab Eintauchen in das heiße Wasser. Wenige Sekunden nach eintauchen sinkt die Anzahl der Nervenimpulse. Etwa 5s nach eintauchen sind keine Nervensignale mehr zu messen (sichtbare kleinere Ausschläge sind höchstwahrscheinlich auf mechanische Änderungen der Gewebe durch Erhitzen zurückzuführen).

Zusammenfassung Ia

Der Messplatz ist seit Ende 2012 einsatzfähig und es wurden seit dem Messungen an 10 Flusskrebse *Astacus Astacus* und an 11 juvenilen Hummern der Art *Homarus gammarus* durchgeführt. Unterschiedliche Ableit- und Reizorte sowie Parameter wurden getestet und die Reizweiterleitung innerhalb des Nervensystems der Tiere gemessen. Als gute Ableitorte für beschichtete Hakenelektroden erwiesen sich die Abdomnalkonnective und die Konnective zwischen Ober- und Unterschlundganglion.

Astacus astacus toleriert 0°C, die Reizweiterleitung wird verlangsamt und die Zahl der gemessenen Potentiale wird stark reduziert. Trotzdem findet noch eine Signalweiterleitung statt. Dies gilt nach den bisherigen Ergebnissen auch für den Hummer *Homarus gammarus*. Juvenile Hummer zeigen kaum Reizweiterleitung innerhalb gefrierenden Seewassers (-1,8°C). Bei 0°C ist eine schwache Signalweiterleitung messbar.

Ab etwa 30-35°C findet bei *Astacus astacus* fast keine oder keine Reizweiterleitung mehr statt. Bei schneller Erhitzung (Eintauchen in heißes Wasser) scheint auch bei juvenilen Hummern nach wenigen Sekunden die Reizweiterleitung unterbrochen. Das Gerät zur Elektrobetäubung vom LAVES steht erst ab Mai 2013 zur Verfügung.

Ib. Wichtige Ergebnisse und andere wesentliche Ereignisse des Berichtszeitraums 1.4.2013 - 31.3.2014

Im Berichtszeitraum zwischen April 2013 und März 2014 wurden vornehmlich Experimente an Hummern durchgeführt. Es wurden 84 Hummer für Versuche herangezogen.

Es konnten Versuche zur Betäubung mit 10% $MgCl_2$, CO_2 , durch Herabkühlen ($-1,8^\circ C$), und mittels Elektrobetäubung (LAVES Gerät) durchgeführt werden. Insgesamt wurden 43 „kleine“ Hummer 23 ± 8 g und 28 „große“ Hummer 653 ± 78 g der Gattung *Homarus* erfolgreich im Versuch verwendet.

Während des Berichtszeitraums wurden auswertbare Versuche (d. h. die elektrophysiologischen Messbedingungen waren während des gesamten Versuchszeitraums ausreichend stabil) zur Betäubung von Hummern durch hohe Mg^{2+} Konzentrationen (N=7), CO_2 Betäubung (N=11), durch Herabkühlen (N=18) und durch Elektrobetäubung (N=26) durchgeführt und die Reizweiterleitung (RWL) bestimmt. Für die jeweiligen Kontrollen wurden insgesamt 15 Tiere verwendet und 1 Tier für langsame Erwärmungs-Experimente. Drei große Hummer verstarben nach der Präparation ü/N und wurden für die Erstellung von Vergleichskurven in $100^\circ C$ warmes Wasser überführt. Die Versuchstierzahl sollte möglichst gering gehalten werden. Wenn sich nach einigen Versuchen schon eindeutige Ergebnisse ableiten ließen, wie zum Beispiel bei der $MgCl_2$ -Betäubung, welche bei sehr kleinen Meerestieren sehr gut funktioniert (eigene Experimente an kleine Wirbellosen, hier nicht aufgeführt), bei sieben kleinen Hummern jedoch auch nach einer Stunde zu keiner ausreichenden Betäubung führte, wurde auf weitere Versuche verzichtet. Diese Betäubungsmethode wurde dann als wirkungslos beim Hummer eingestuft.

Wie auch schon in den vorhergehenden Versuchen des letzten Berichtszeitraums wurden mechanische und elektrische Reize gesetzt und deren neuronalen Antworten registriert. Die neuronale Antwort auf Erhitzen konnte mit und ohne vorherigen Einsatz des LAVES- Elektrogerätes, CO_2 -Betäubung und Mg^{2+} Betäubung aufgezeichnet werden, während die Hummer nach dem Vorbild von Köchen und anderen Krebskochern in siedendes Wasser überführt wurden.

Technische Details der Auswertung stehen am Anfang dieses Berichts. Die Auswertung der relativen Reizantwort, welche sich als sehr deutlich erwies, wurde folgendermaßen durchgeführt: Als Referenz wurde ein 5 s dauernder Zeitabschnitt vor der Reizung verwendet und mit den ersten 5 s während der Reizung verglichen und ins Verhältnis gesetzt. Hierbei wurden die Powerspektren (FFT) der Zeitabschnitte verglichen. Damit erhält man eine Normierung der Ruhe-/Reaktions-Antworten.

Wirkung von Herabkühlen auf -1,8°C

Bei 18 Tieren (8 kleinen und 10 großen Hummern) wurde die Reizweiterleitung nach Herabkühlen auf -1,8°C untersucht. Wie auch schon im ersten Bericht beschrieben, führt herabkühlen nicht zur einer vollständigen Reduktion der Reizweiterleitung im Nervensystem der Tiere. Das Grundrauschen der Ableitung und auch die Reizantwort werden stark reduziert, jedoch nicht völlig unterbunden. Die Tiere sind teilweise sogar noch zu langsamen Bewegungen fähig.

Die Hummer wurden 30-60 Minuten in einem Wasserbad von geschmolzenem Meereis abgekühlt. Das Wasser hatte eine Temperatur von ungefähr -1,8°C. In diesem Zeitraum nahm die Amplitude der Ruheaktivität im ZNS um mehr als die Hälfte ab: bei kleinen Hummern auf $0,465 \pm 0,45$, bei großen Hummern auf $0,45 \pm 0,33$ ab. Eine Reizweiterleitung war aber auch nach 60 Minuten noch vorhanden und das Verhältnis von Ruheaktivität zu Reizantwort veränderte sich nur wenig (kleine Hummer) bzw. nicht wesentlich (große Hummer).

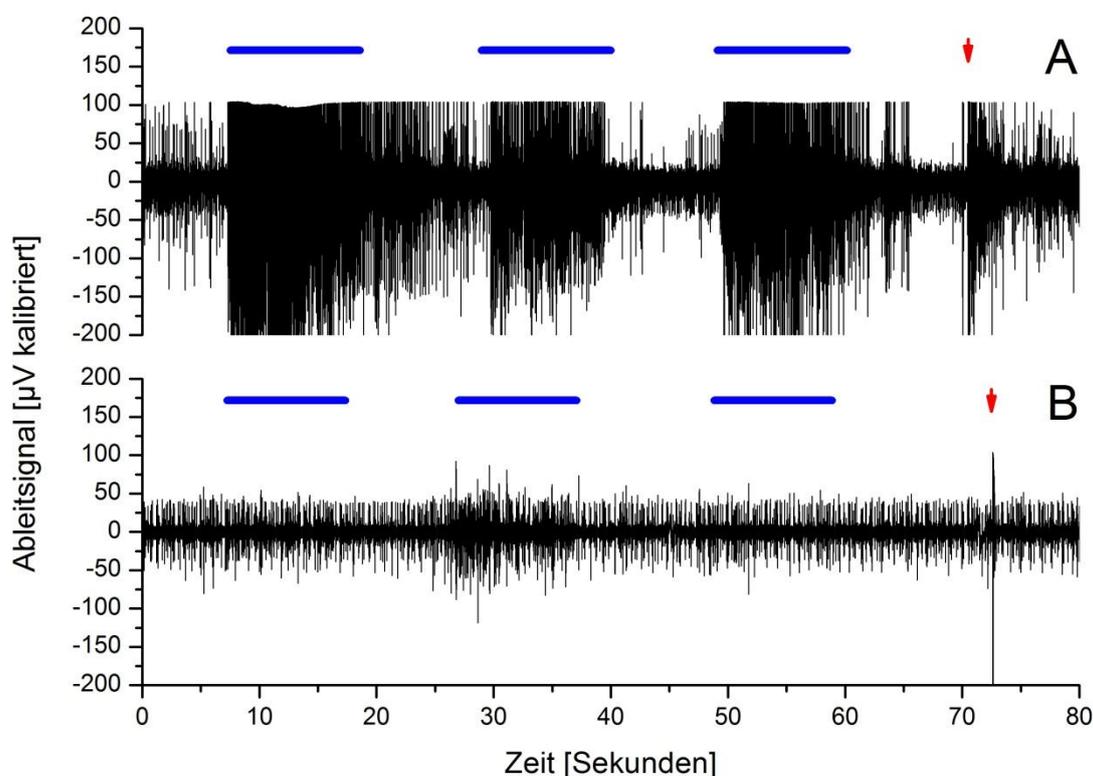


Abb. 7: Beispiel für Reizweiterleitung bei einem kleinen Hummer bei mechanischen Stimulationen an Kopf/Telson/Schreitbeine für jeweils ca. 10 Sekunden (blaue Marker) und elektrischer Reizung an den Antennen für 10 ms (roter Pfeil). [A] Bei Halterungstemperatur (7°C): Alle Reizungen stimulieren eine starke Antwort des ZNS. [B] Nach 60 min in Eiswasser (-1,8°C): Eine leichte Reizweiterleitung ist teilweise noch vorhanden. Das Grundniveau der Nervensystemaktivität ist erniedrigt.

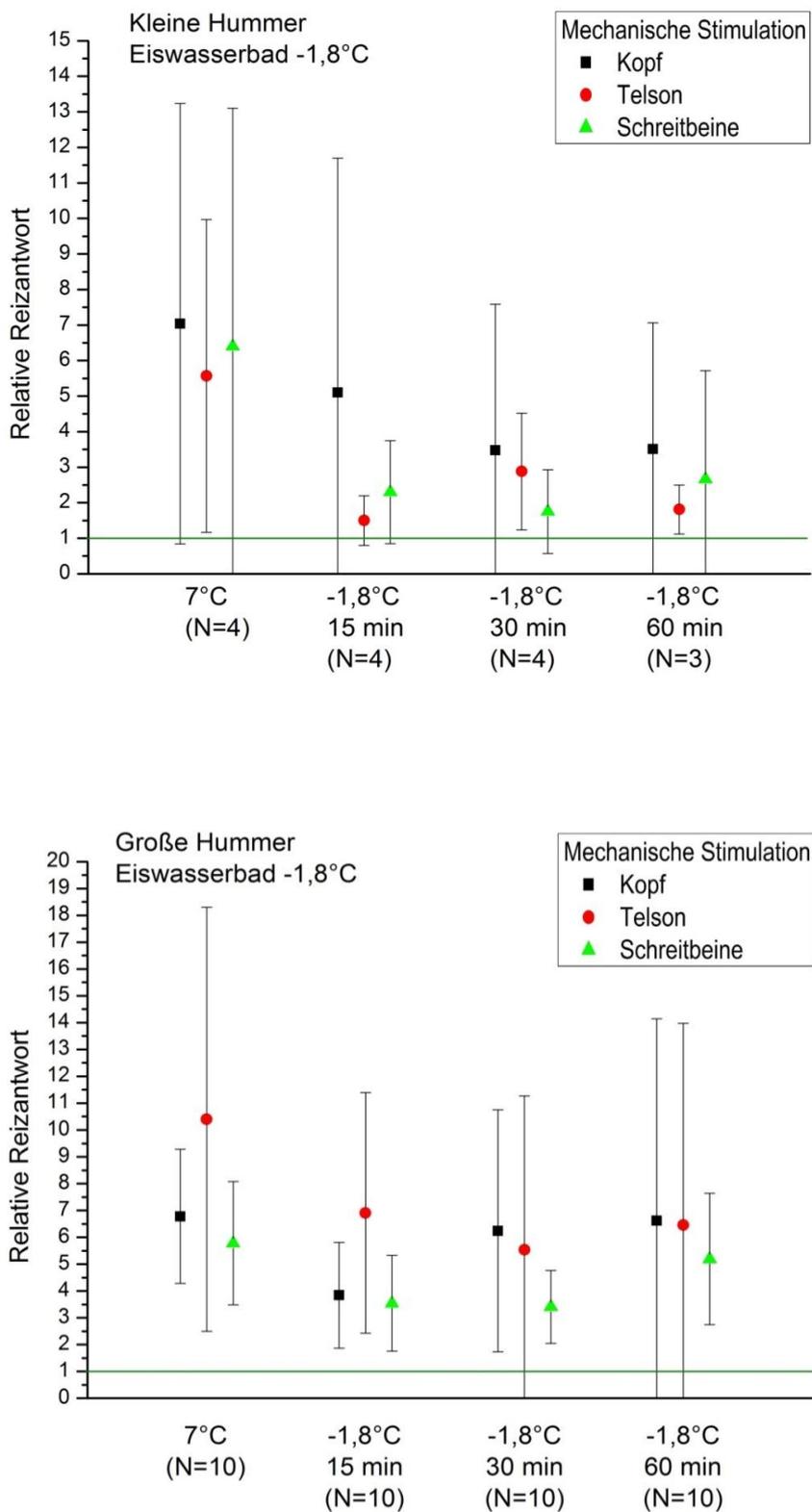


Abb. 8: Reizweiterleitung bei kleinen (oben) bzw. großen (unten) Hummern im Eiswasserbad ($-1,8^{\circ}\text{C}$). Eine Reizweiterleitung ist nicht mehr vorhanden, wenn die relative Reizantwort gegen 1 geht (grüne horizontale Linie), d.h. Grundaktivität und Reizantwort gleich groß sind.

Wirkung der Gabe von 10% $MgCl_2$ in das Versuchsbecken

An 7 kleinen Hummern wurde die Betäubung durch Gabe von 10% (W/V) $MgCl_2$ in das Wasser des Versuchsbeckens versucht herbeizuführen. Nach einer Stunde waren die Bewegungen der Tiere zwar verlangsamt und beeinträchtigt und die Tiere teilweise relaxiert, es kann jedoch nicht von einer Betäubung gesprochen werden. Die Grundaktivität im ZNS verringerte sich von 1 auf $0,83 \pm 0,42$. Eine Reizweiterleitung RWL war noch vorhanden.

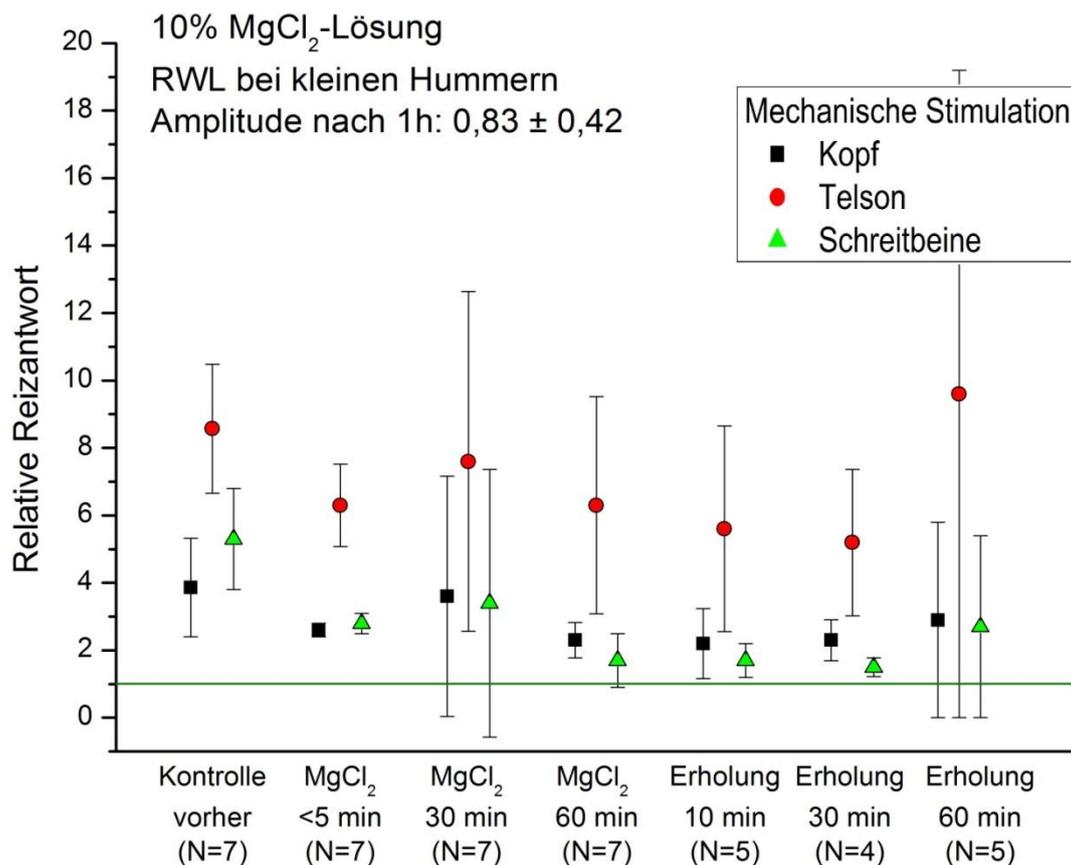


Abb. 9: Reizweiterleitung bei kleinen Hummern, die in Seewasser mit 10%iger $MgCl_2$ -Zugabe für 60 Minuten inkubiert wurden. Die Amplitude der Grundaktivität geht leicht zurück, die Reizantworten sind aber nach 60 Minuten noch vorhanden.

Wirkung erzeugt durch Einblasen von CO₂ in das Versuchsbecken

An 11 Hummern wurde eine Betäubung mittels Gabe von CO₂ ins Versuchsbecken versucht herbeizuführen. Nach etwa 7-60 min (kleine Hummer 7-15 min, große Hummer 20-60 min) Begasung mit CO₂ waren die Tiere vollständig relaxiert, die Reizweiterleitung stark eingeschränkt. Die Bewegungsunfähigkeit war in der Regel reversibel.

Die Tiere wurden in einem passenden Aquarium an einem Stativ befestigt und anschließend von ventral im Kopf/Thorax-Bereich mit CO₂ begast, welches aus einem großen Lüfterstein ausperlte. Der Blasenvorhang umhüllte das komplette Vorderende der Tiere und der gesamte Wasserkörper war gesättigt mit kleinen Gasblasen, die wild herumwirbelten. Das Wasser wurde vor der Überführung der Tiere für 20 Minuten mit CO₂ begast. Der pH des Wassers lag dann bei ca. 4,95, der Sauerstoffgehalt bei ca. 19% (zusätzlich begast). Die Tiere wurden individuell unterschiedlich lange CO₂ exponiert, bis bei den Tieren eine komplette Relaxation eintrat. Bei diesen Tieren war mit elektrophysiologischen Ableitungen eine Reizweiterleitung anhand des Echtzeitsignals nicht mehr erkennbar. In der FFT-Auswertung ist hier allerdings noch ein Unterschied in der relativen Reizantwort erkennbar.

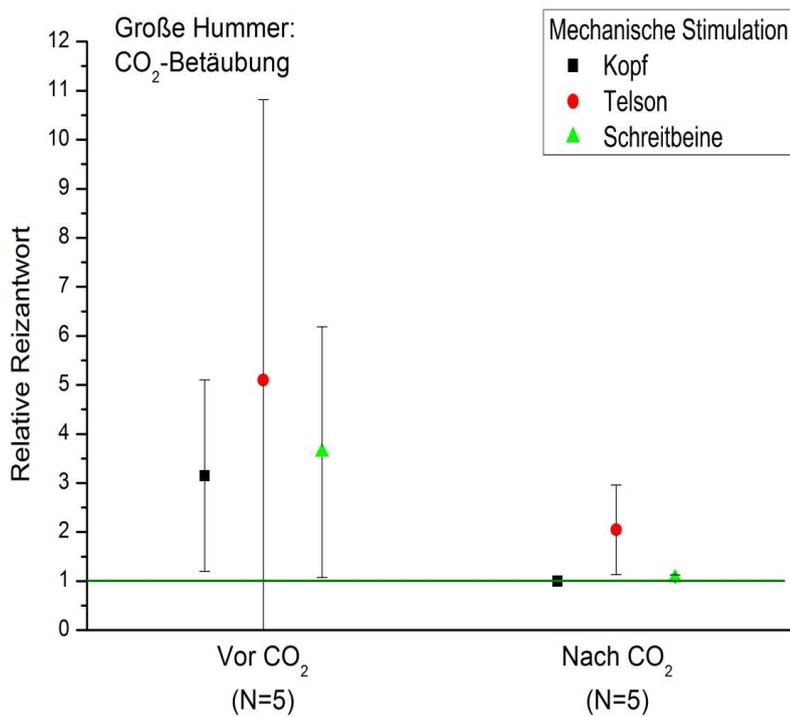
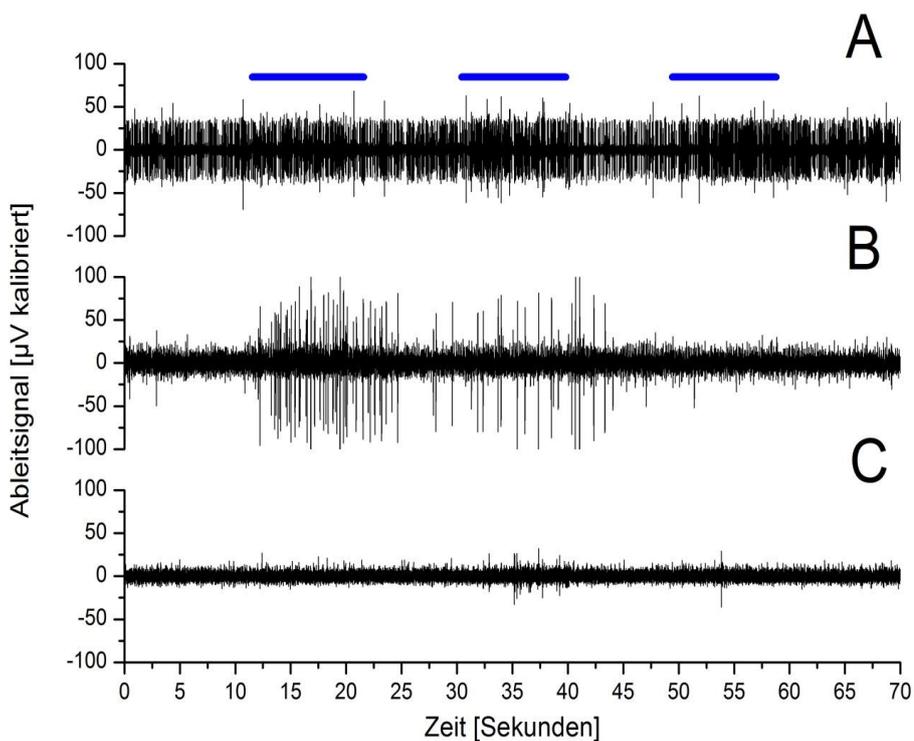


Abb. 10: Oben: Reaktionen auf mechanische Stimulationen an Kopf, Telson und Schreitbeinen (blaue Marker) [A] vor, [B] nach 30 Minuten und [C] nach 60 Minuten CO_2 -Betäubung eines großen Hummers. Vor der Betäubung ist eine hohe Aktivität im Nervensystem feststellbar, welche bei mechanischer Reizung weiter ansteigt. Abb. unten: Relative Reizantworten vor und nach CO_2 Behandlung

Reizweiterleitung bei langsamer Erwärmung

Um zu testen, ob langsame Erwärmung eine alternative Betäubungs- oder Tötungsmethode darstellt, wurde ein großer Hummer langsam von der Hälterungstemperatur 7°C auf 38°C erwärmt, mit einem Temperaturanstieg von 16,8°C pro Stunde. Vorher wurden 5 kleine Hummer langsam auf 15-20°C erwärmt und anschließend wieder auf Hälterungstemperatur abgekühlt, was die Tiere ohne bleibende Schäden überstanden.

Bei dem bis auf 38°C erwärmten Tier wurde die Letalitätsschwelle überschritten. Die Ruheaktivität des ZNS stieg bis ca. 22°C langsam um das ca. dreifache an, um anschließend langsam abzufallen, bis sie bei ca. 30°C beim Ausgangswert angekommen war und anschließend gegen Null ging. Das Tier saß die ganze Zeit über relativ ruhig im Becken und zeigt bei mechanischen Stimulationen bis ca. 20°C normales Verhalten, ab ca. 25°C reagierte es kaum noch bzw. gar nicht mehr.

Die mechanischen Stimulationen an Kopf und Telson während des Erwärmungsvorgangs zeigen eine Abnahme der Antwortamplitude in Abhängigkeit von der ansteigenden Temperatur, wobei die relative Reizantwort im Telson länger messbar war. Die Reizweiterleitung war ab ca. 30° nicht mehr vorhanden. Anschließend wurde das Tier in 100°C warmes Wasser überführt. Dabei wurde kein signifikanter Anstieg der Aktivität gemessen. Langsame Erwärmung wurde von diesem Tier offensichtlich toleriert bis zum Eintritt des Todes.

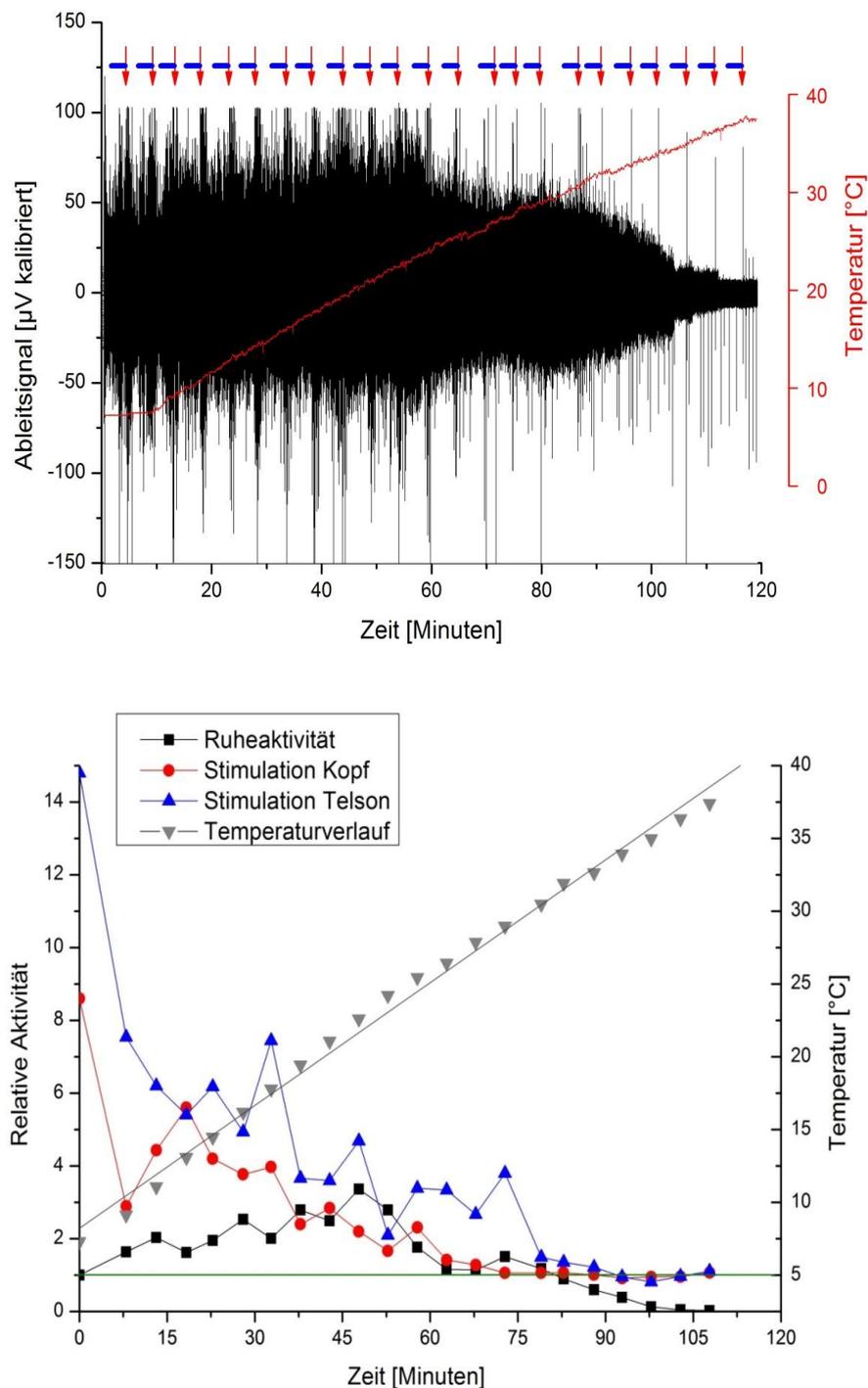


Abb. 11: Oben: Langsame Erwärmung eines großen Hummers auf ca. 38°C . Ableitung: schwarz. Temperaturverlauf: rot. Das Tier wurde regelmäßig mechanisch und elektrisch stimuliert (blauer Balken: mechanisch; roter Pfeil: elektrisch). Unten: Darstellung der Abhängigkeit der Ruheaktivität sowie der dazu relativen Antworten bei Stimulation des Tieres an Kopf bzw. Telson in Abhängigkeit von der Temperatur.

Elektrobehandlung mit dem LAVES Gerät

Das vom LAVIS zur Verfügung gestellte Elektrobetäubungsgerät wurde uns mit einem dazugehörigen Betäubungsbecken geliefert (Innenmaße 48,5x28,5x16 cm), bei dem der Elektrodenabstand nicht variiert werden kann. Wir haben daher für die Messungen an kleinen Hummern ein neues, kleineres Betäubungsbecken (25x15x12 cm) gebaut, bei dem der Elektrodenabstand kontinuierlich von 0 bis 12 cm variiert werden kann.

Insgesamt wurden 26 Experimente zur Elektrobetäubung an Hummern durchgeführt. Einige Hummer wurden nach erfolgter Elektrobetäubung auf etwaige Erholung untersucht, andere direkt in siedendes Wasser gegeben um eine etwaige Betäubung praxisnah zu testen.

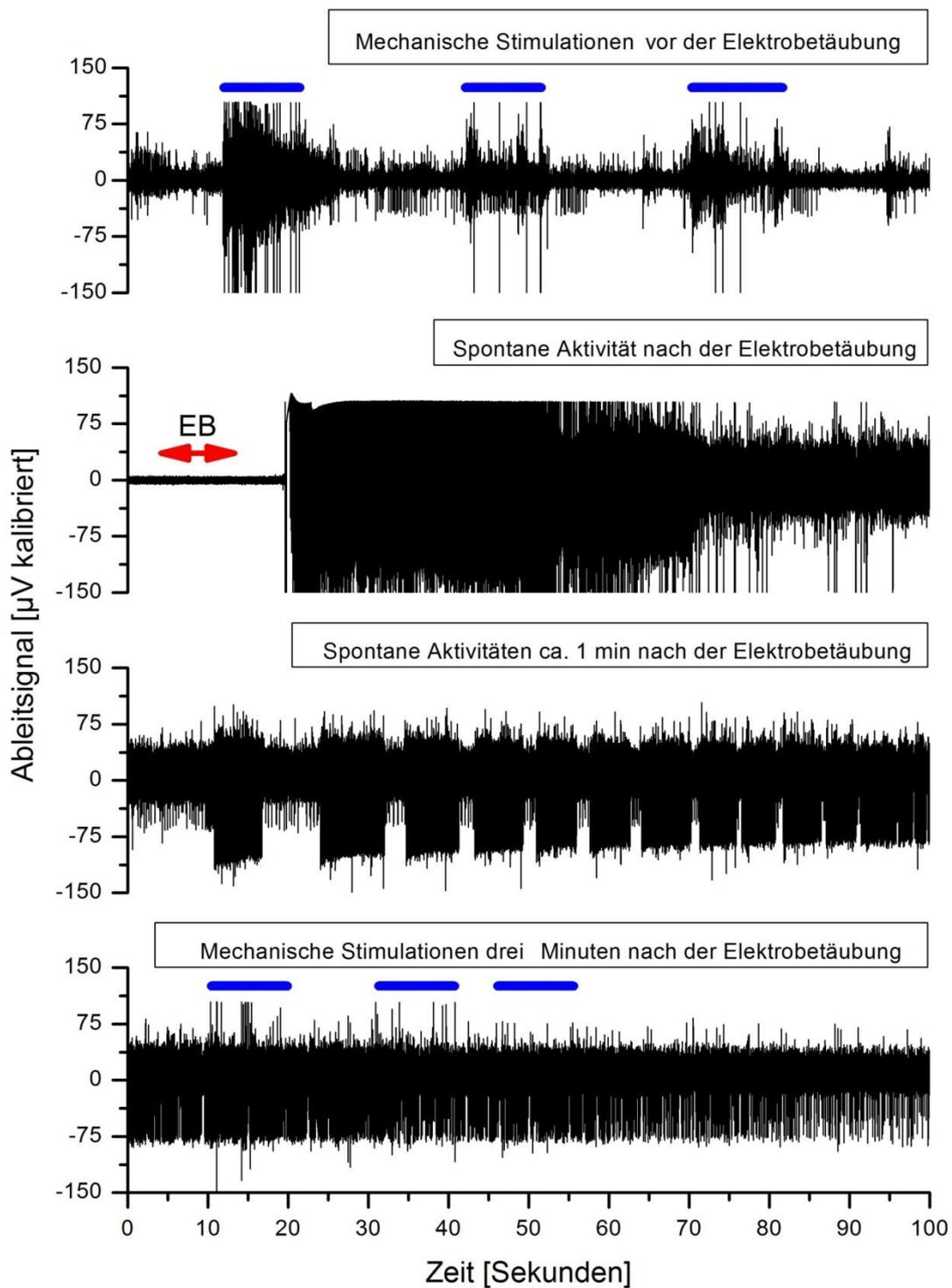
Zuerst wurde die Elektrobetäubung in Seewasser versucht (N=4), was jedoch nicht zum gewünschten Erfolg führte, auch nicht bei maximaler Stromstärke und Einwirkungszeit (10s). Die Leitfähigkeit des Seewassers ist so hoch, dass der Strom nicht durch das Tier, sondern durch das Umgebungswasser abfließt. Das Tier kann daher nahezu unbeeinträchtigt sein. Erst nach Reduzierung des Salzgehaltes auf 1/10 des Ausgangswertes, konnten erfolgreiche Experimente durchgeführt werden.

Die Mindestreizdauer, welche zur Betäubung bei maximaler Reizstärke (5 A) führt wurde durch verschiedene Reizdauern von 1 s, 5 s und 10 s an 5 Hummern genauer untersucht. Die wirksamste Reizdauer lag erwartungsgemäß bei 10 s und konnte nicht erfolgreich unterschritten werden.

17 Hummer wurden somit mit der maximal möglichen Reizstärke von 5 A, 20 V Gleichstrom für 10 s in verdünntem Seewasser (1/10) ausgesetzt. Hierbei zeigten sich grundsätzlich zwei unterschiedliche Messergebnisse trotz des klar betäubten Phänotyps der Tiere. Alle Tiere waren augenscheinlich vollständig relaxiert nach Einsatz des vorhandenen Elektrogerätes.

Die elektrophysiologischen Messergebnisse im Nervensystem der Tiere zeigten jedoch kein einheitliches Bild. Bei einigen kleinen Tieren war eine Reduktion der Grundaktivität des ZNS zu messen sowie eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Reduktion der induzierten Reizantworten.

Im weitaus größeren Teil der untersuchten Tiere war jedoch die Grundaktivität nach Elektroschock stark erhöht, was eine Ähnlichkeit zu einem induzierten „epileptischen“ Anfall nahelegt. Die Reizantworten auf die mechanischen und elektrischen Reize waren im erhöhten Rauschen der Signale nicht zu finden, d. h. die Signale wurden durch die induzierte Grundaktivität vollständig verdeckt.



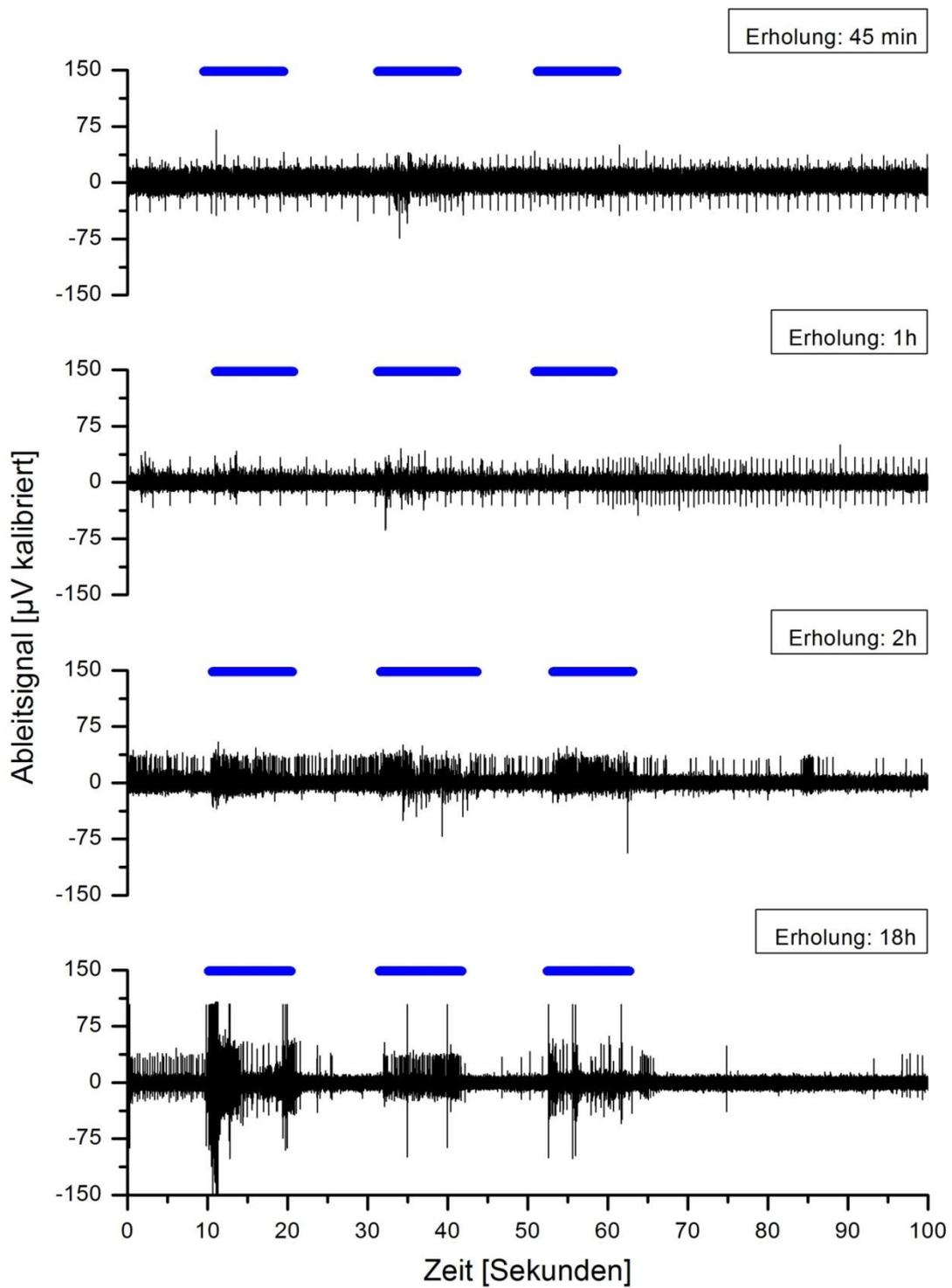


Abb. 12: Reizantworten eines Beispieltieres (kleiner Hummer) auf mechanische Stimulationen vor und nach Elektrobetäubung.

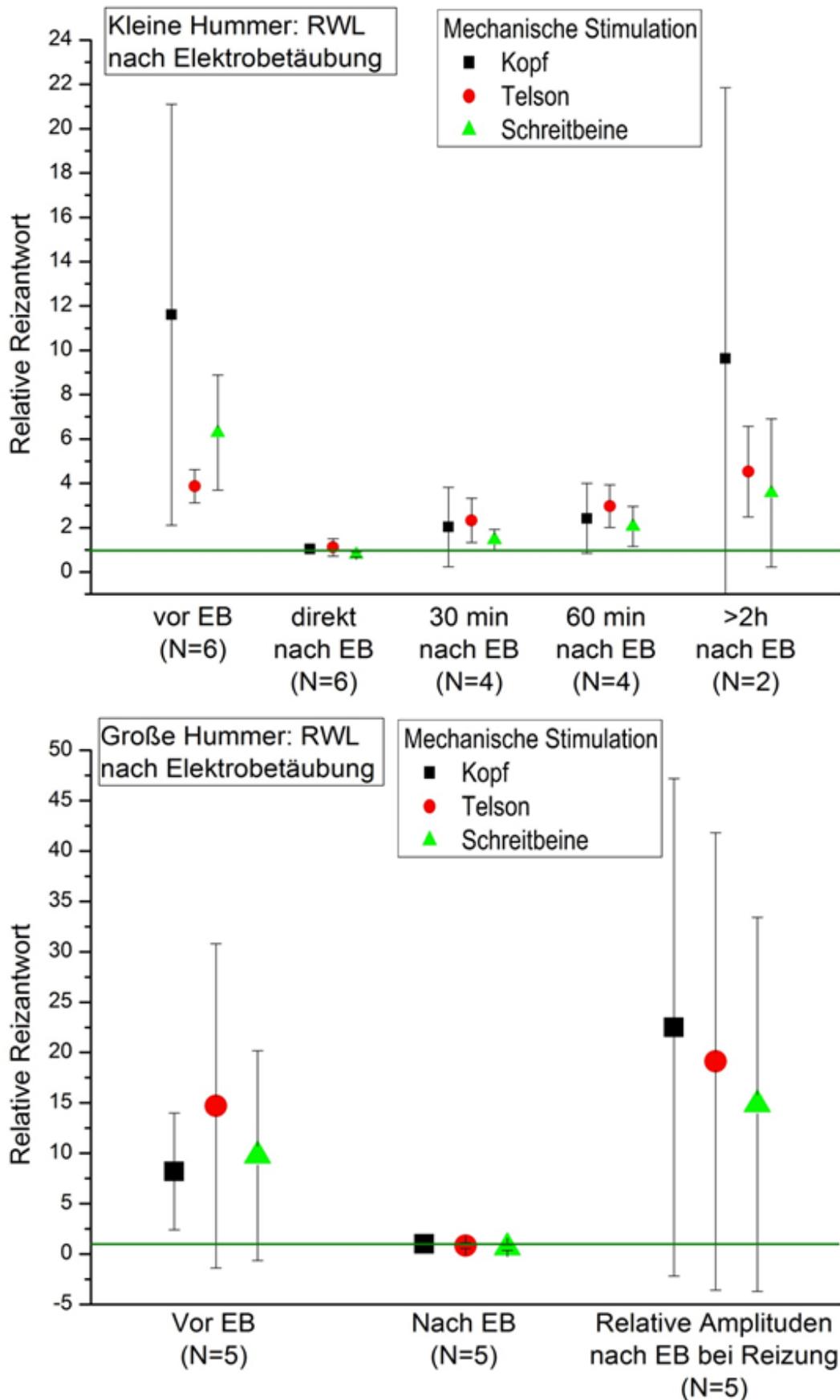


Abb. 13. Relative Reizantworten auf mechanische Stimulationen vor und nach Elektrobetäubung bei kleinen (oben) und großen (unten) Hummern. Nach Elektrobetäubung (EB) ist scheinbar keine Reizweiterleitung (RWL) vorhanden. Diese ist aber nicht nachweisbar, da die Amplitude der „Grundaktivität“ ein Vielfaches des Kontrollsignals beträgt.

Überführung der Tiere in kochendes Wasser mit und ohne vorheriges Betäubungsverfahren

22 kleine und 28 große Hummer wurden in kochendes Wasser überführt und dabei die Aktivität der implantierten Elektroden aufgezeichnet.

Ein Tier wurde als tot angesehen, wenn das Signal $< 150\%$ der Amplitude des Grundrauschen des toten Tieres abgesunken war (Schwellenwert). Die Tiere wurden manuell in das Kochgefäß überführt. Dabei traten teilweise starke Signale auf, die eine Mischung aus Aktivität des Tieres selbst (ohne Betäubung teilweise sehr starke Gegenwehr) sowie elektrostatischer Ladungen durch den Kontakt mit dem Experimentator ergaben. Dabei ging der Verstärker manchmal in Sättigung. Nach Überführung in das kochende Wasser wurde bei allen Versuchsgruppen ein massiver Anstieg der Signale festgesetzt; teilweise ging der Verstärker auch hier in Sättigung oder schaltete einen internen Überlastschutz ein (das Signal geht dann auf 0 zurück). Daher sind nicht bei allen Tieren Aufzeichnungen über den ganzen Messvorgang vorhanden, und Daten-Mittlungen der Aufzeichnungen in den ersten ca. 15 s nicht in allen Fällen zuverlässig. Teilweise treten Störsignale auf, auch viele Minuten nachdem das Tier tot sein dürfte. Durch den Kochvorgang wird z.B. auch die Integrität und Beschaffenheit der Kutikula der Tiere verändert.

Die Dauer der elektrophysiologischen Signale der verschiedenen Versuchsgruppen innerhalb der beiden Kohorten „kleine Hummer“ und „große Hummer“ war nicht signifikant unterschiedlich (ANOVA $p > 0,05$) (Tabelle 1).

Die Tiere sind beim Kochvorgang relativ ruhig, d.h. normales Fluchtverhalten wie der Schwanzfächerschlag „tail flip“ waren nicht oder nur in Ausnahmefällen beobachtbar. Es traten allerdings Signale auf, die aussahen wie die Signale von richtigen Schwanzfächerschlägen, auch wenn das Tier ruhig lag, und die wir „virtuelle Schwanzfächerschläge“ nennen. Diese sind mit einem sehr starken kurzzeitigen Anstieg der Signale verbunden. Sie stammen vermutlich von leichten Zuckungen der Abdominalmuskulatur.

Die ersten Sekunden während des Kochvorgangs sind die Tiere meist bewegungslos. Anschließend treten einzelne, unkoordinierte Zuckungen in allen Körperteilen auf, auch bei sonst relaxierten Tieren, und es tritt Mageninhalt aus. Die Zuckungen in den Beinen und im Abdomen treten teilweise noch auf, wenn der Verstärker keine Signale mehr aufzeichnet. Nach einiger Zeit sowie beim Abkühlvorgang können allerdings erneut Signale entstehen, welche wahrscheinlich durch die Hitzeeinwirkung auf die Elektroden und das Gewebe hervorgerufen werden. In den meisten Fällen lassen sich im FFT-Spektrum dann Vielfache von 50 Hz (Netzbrummen) feststellen.

Als Kontrollen zu den Betäubungsverfahren wurden 7 kleine und 8 große Hummer verwendet.

Drei tote Tiere (verstorben in der Erholungsphase nach der Präparation) wurden ebenfalls zur Kontrolle ins siedende Wasser überführt. Ein langsam durch Erwärmung getötetes Tier wurde ebenfalls zur Kontrolle gemessen.

Tabelle 1. Übersicht über die Zeiträume, die beim Kochvorgang bis zur Unterschreitung des definierten elektrophysiologischen Schwellenwerts vergehen.

Methode	Hummer klein (23,1 ± 8,2 g) Zeit bis Schwellenwert [Sekunden]	Hummer groß (653,25 ± 78,4 g) Zeit bis Schwellenwert [Sekunden]
7°C → 100°C	46,9 ± 11,6 (N=7)	154,7 ± 30,3 (N=8)
-1,8°C → 100°C	53,3 ± 14,9 (N=8)	222,9 ± 74,5 (N=10)
Elektrobetäubung 10 Sek Maximaleinstellung → 100°C	58,7 ± 17,5 (N=6)	149,6 ± 18,15 (N=5)
CO ₂ → 100°C	55 ± 0 (N=1 (keine weiteren Tiere))	172,4 ± 61,13 (N=5)
ANOVA (p > 0,05)	Keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte	Keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte

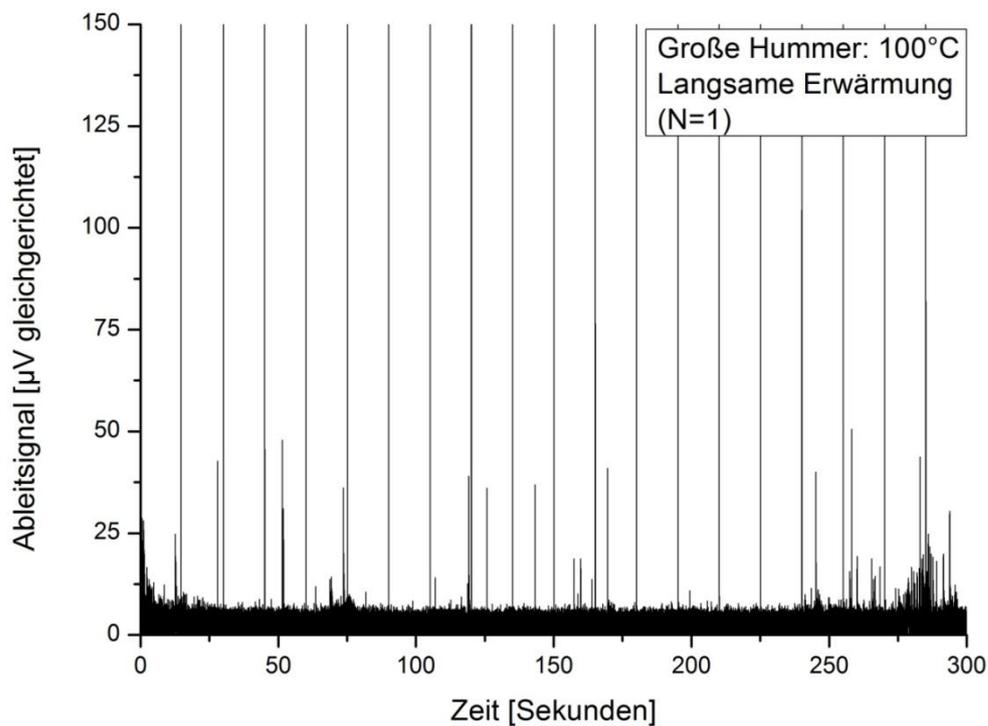
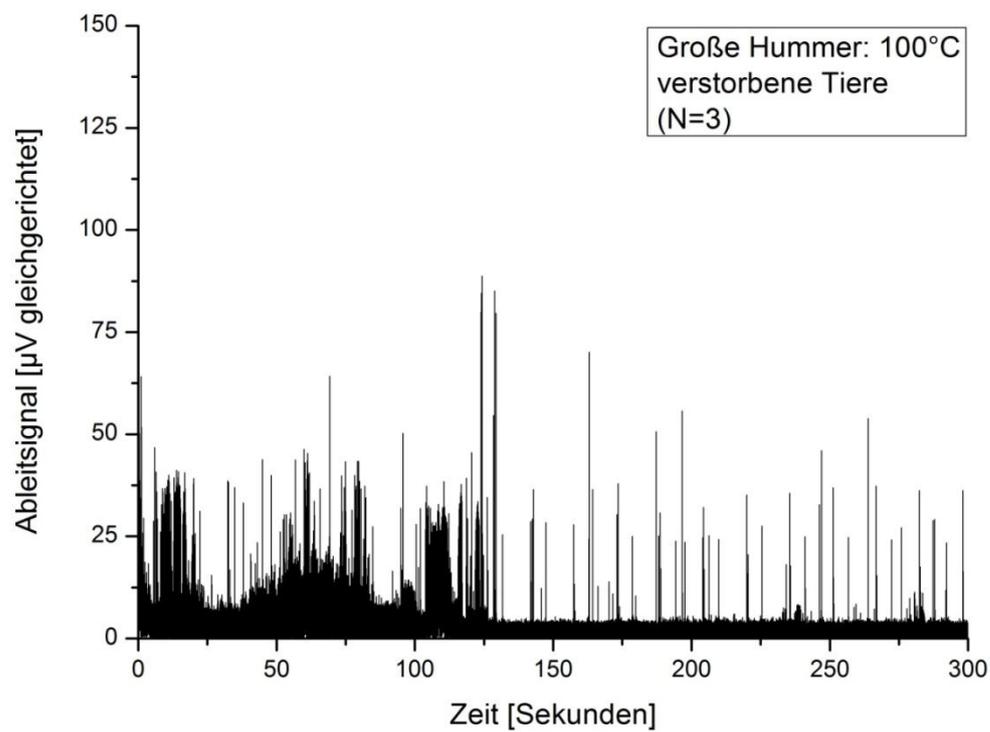


Abb. 14: Oben: Signale kurz vorher verstorbener Tiere nach Gabe in siedendes Wasser. Unten: Durch langsame Erwärmung getöteter Hummer nach Gabe in siedendes Wasser

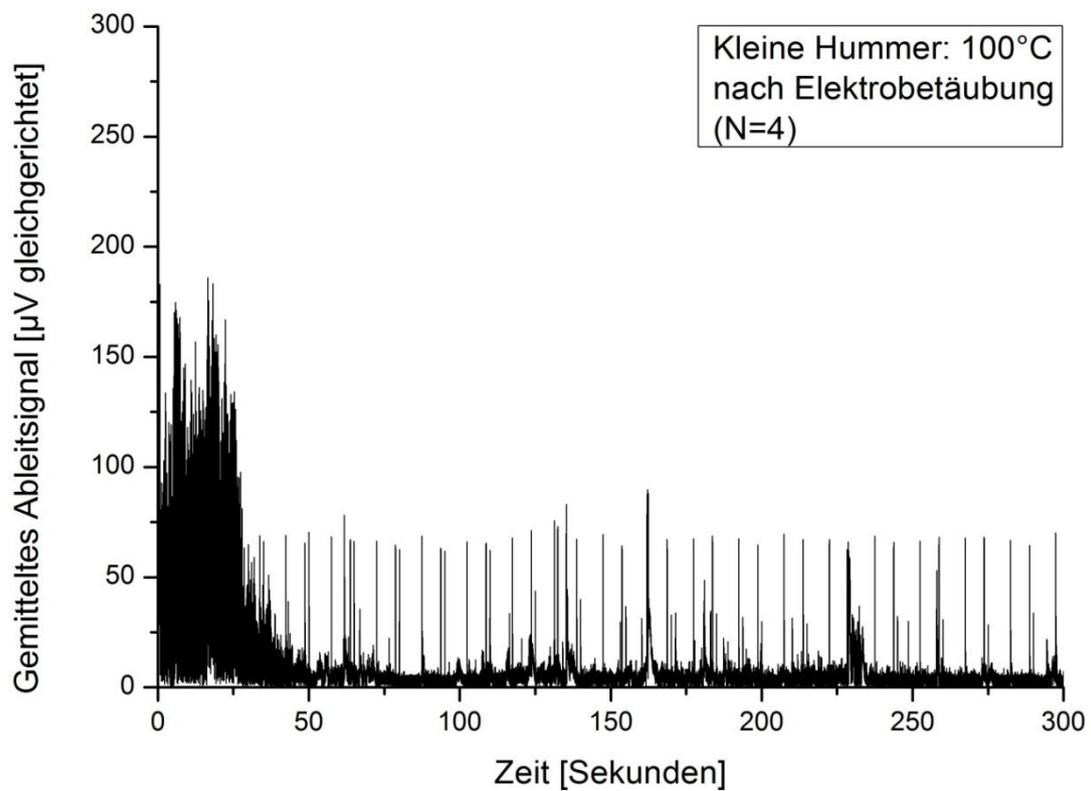
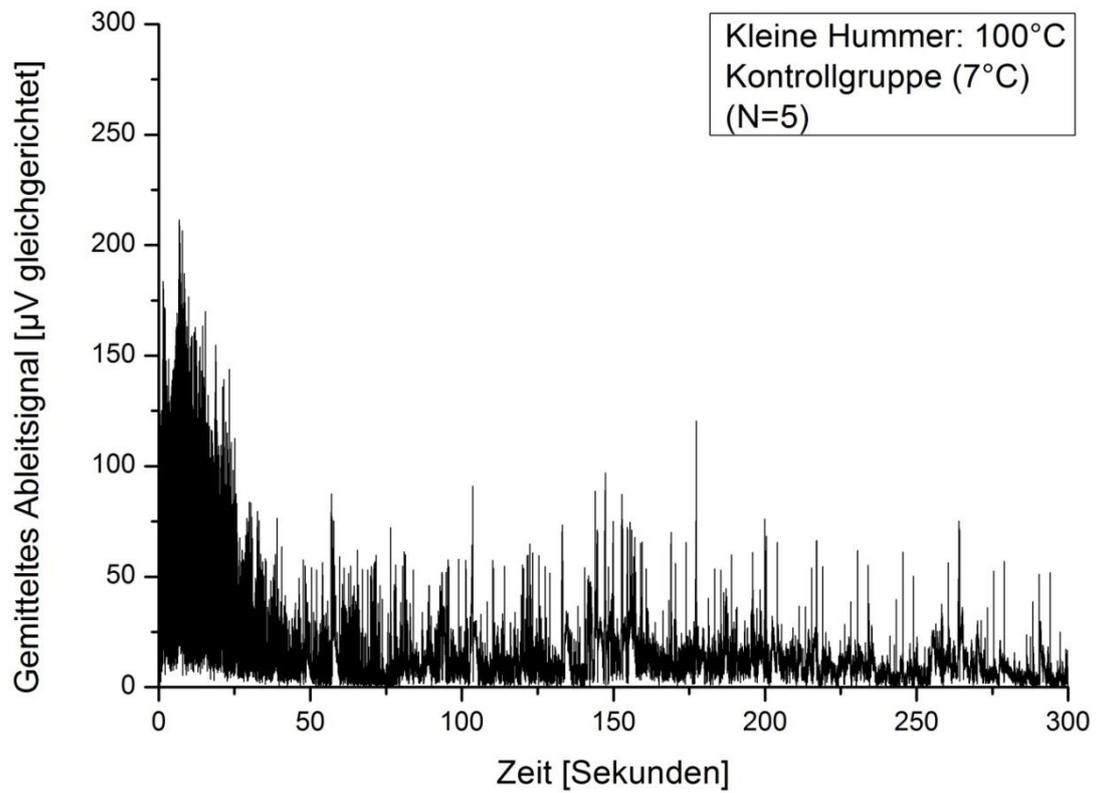


Abb. 15. Oben: Messung von Signalen in siedendem Wasser (Kontrolltiere). Unten: Messung von Signalen in siedendem Wasser nach Elektrobetäubung.

Zur zusammenfassenden Auswertung der erfolgten Experimente wurden die Signale mittels FFT analysiert und der Verlauf der Powerspektren im Zeitverlauf dargestellt. Die Powerspektren geben auch hier den Erregungszustand des Nervensystems wieder indem sie den Frequenzgehalt der Signale sowie deren Energieinhalt aufzeigen.

Tote Tiere zeigen keine Veränderungen der Signale über den Zeitverlauf und sehr geringe Integrale der FFT. Die Kontrolltiere zeigen ein reges Signalaufkommen und eine ausgeprägte Antwort. Durch Kälte und CO₂ behandelte Tiere zeigen ein ähnliches Signalaufkommen, während die elektrobetäubten Tiere scheinbar (nicht signifikant) die höchste neuronale Aktivität zeigen.

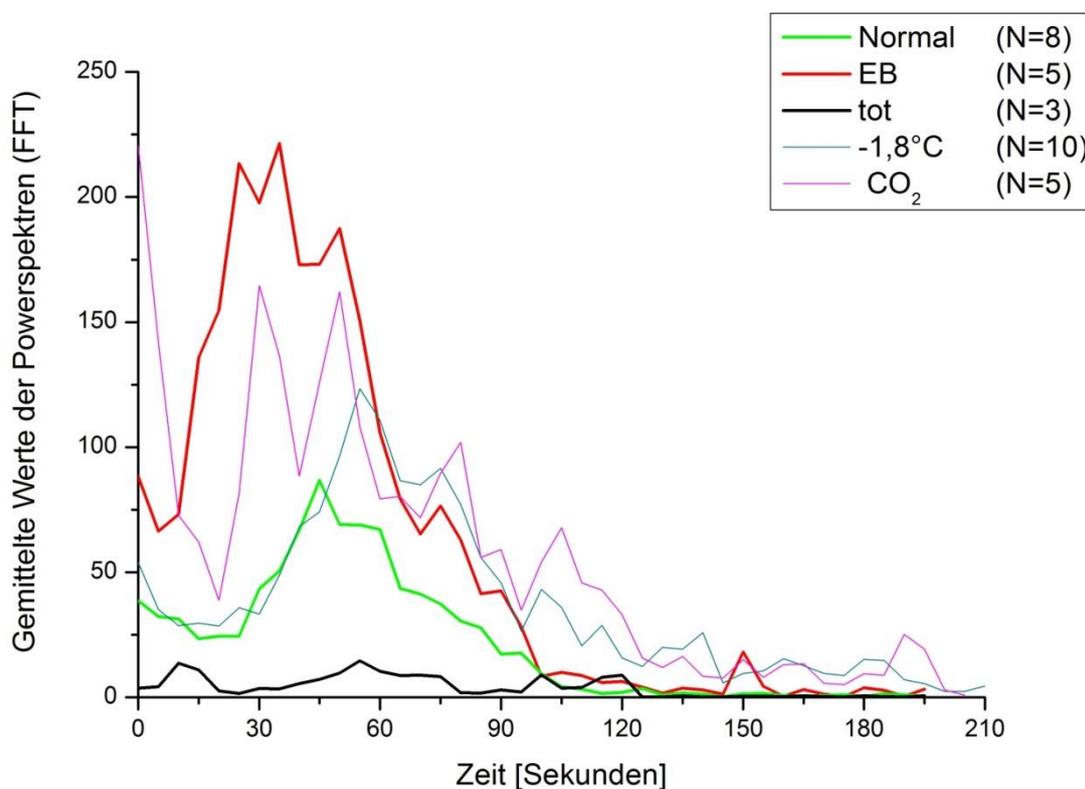


Abb. 16: Gemittelte Werte der FFTs von aufgezeichneten Signalen der Tiere verschiedener Versuchsgruppen (Große Hummer) aufgetragen über die Zeit in 5 s Intervallen. Tote Tiere dienen als Kontrolle, Normal ist unbehandelt und CO₂, -1,8°C und EB bezeichnet die Behandlungsverfahren.

Zusammenfassung Ib

Elektrophysiologische Signale im Zentralnervensystem der Tiere wurden während elektrischer (Antennen) und mechanischer (Kopfregion, Telson, Schreitbeine) Stimulation aufgezeichnet. Die Tiere wurden versucht zu betäuben durch: Abkühlung ($-1,8^{\circ}\text{C}$), CO_2 Begasung, MgCl_2 Badapplikation und Elektrobehandlung (LAVES Gerät). Nach Elektrobehandlung und CO_2 Behandlung waren die Tiere vollständig relaxiert. Die Inhibition der nervösen Weiterleitung bei mechanischer Stimulation konnte nur mittels CO_2 Begasung und teilweise der Elektrobehandlung erreicht werden. Herabkühlen verlangsamte und reduzierte die Reizantworten, inhibierte sie aber nicht im Untersuchungszeitraum. Ähnliches gilt für die MgCl_2 Behandlung. Eine Elektrobehandlung erzeugte im ZNS häufig starke Erregungszustände, welche die Antworten auf die Reizsignale überdeckte und deshalb diese nicht nachweisbar waren. Bei Überführung der Tiere in 100°C Wasser zeigte keines der Verfahren einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollversuchen.

Fazit Ib

CO_2 -Behandlung sowie Elektrobehandlung sind bei Hummern zur Relaxation einsetzbar und erlauben eine zumindest partielle Inhibition der Reizweiterleitung der Peripherie in das ZNS. CO_2 -Behandlung erfordert eine sehr lange Einwirkzeit und lässt diese Methoden als nicht praktikabel erscheinen.

Die Elektrobehandlung (LAVES Gerät) kann zu starken Erregungszuständen im ZNS führen und trotzdem die Tiere vollständig relaxieren. Alle verwendeten Methoden zeigen keinen signifikanten Einfluss auf zentrale Nervensignale während des Kochvorgangs.

6. Anhang Ib

Tabelle 2: Übersicht Abkühlung $-1,8^{\circ}\text{C}$ kleine und große Hummer

Tabelle 3: Abkühlung kleine Hummer Wertetabelle RWL

Tabelle 4: Abkühlung große Hummer Wertetabelle RWL

Tabelle 5: Übersicht MgCl_2 bei kleinen Hummern

Tabelle 6: MgCl_2 10% bei kleinen Hummern Wertetabelle RWL

Tabelle 7: Übersicht CO_2 kleine und große Hummer

Tabelle 8: CO_2 bei kleinen Hummern Wertetabelle RWL

Tabelle 9: CO_2 bei großen Hummern Wertetabelle RWL

Tabelle 10: Übersicht Elektrobetäubung bei kleinen und großen Hummern

Tabelle 11: Elektrobetäubung bei kleinen Hummern Wertetabelle RWL

Tabelle 12: Elektrobetäubung bei großen Hummern Wertetabelle RWL

Tabelle 13: Übersicht über die in 100°C warmes Wasser überführten Hummer

Tabelle 2. Abkühlung von Hummern in -1,8°C Wasser für 60 Minuten.		
	Kleine Hummer	Große Hummer
Anzahl	4	10
Reizamplitude nach 1h bei -1,8°C	0,465 ± 0,45	0,45 ± 0,33
Visuelle Bewertung der Betäubung nach 1h	Tw. relaxiert, träges Verhalten, Reflexe vorhanden (z.B. Bewegung der Augen bei Berührung)	Tw. relaxiert, träges Verhalten, Reflexe vorhanden (z.B. Bewegung der Augen bei Berührung)
RWL nach 60 min bei -1,8°C	Vorhanden	Vorhanden

Tabelle 3. Reizweiterleitung bei kleinen Hummern in Eiswasser (-1,8°C).			
	Verhältnis Grundaktivität/Reiz	SD	Stimulationsort
Vorher (N=4)	7,04	6,2	Kopf
	5,57	4,4	Telson
	6,4	6,7	Schreitbeine
0-15 min Eiswasser (N=4)	5,1	6,6	Kopf
	1,5	0,7	Telson
	2,3	1,45	Schreitbeine
30 min Eiswasser (N=4)	3,48	4,11	Kopf
	2,88	1,64	Telson
	1,75	1,18	Schreitbeine
60 min Eiswasser (N=3)	3,51	3,55	Kopf
	1,81	0,69	Telson
	2,66	3,06	Schreitbeine

Tabelle 4. Reizweiterleitung bei großen Hummern in Eiswasser (-1,8°C).			
	Verhältnis Grundaktivität / Reiz	SD	Stimulationsort
Vorher	6,78	2,5	Kopf
	10,4	7,9	Telson
	5,78	2,3	Schreitbeine
0-15 min Eiswasser (N=10)	3,84	1,97	Kopf
	6,91	4,48	Telson
	3,54	1,79	Schreitbeine
30 min Eiswasser (N=10)	6,24	4,51	Kopf
	5,54	5,73	Telson
	3,41	1,36	Schreitbeine
60 min Eiswasser (N=10)	6,62	7,52	Kopf
	6,46	7,52	Telson
	5,19	2,45	Schreitbeine

Tabelle 5. Inkubation von kleinen Hummern in 10% MgCl ₂ für eine Stunde.		
	Kleine Hummer	Große Hummer
Insgesamt Anzahl	7	Nicht untersucht
Anschließend in 100°C	2	
Anschließend Erholungsphase	5	
Erholungsphase überlebt	2	
Erholungsphase nicht überlebt	3	
Reizamplitude nach 1h in 10% MgCl ₂	0,83±0,42	
Visuelle Bewertung der Betäubung nach 1h	Teilweise sehr relaxiert, träges Verhalten, Reflexe vorhanden (z.B. Bewegung der Augen bei Berührung)	
RWL nach 60 min in 10% MgCl ₂	Vorhanden	

Tabelle 6. Reizweiterleitung bei kleinen Hummern in 10% MgCl ₂ in Seewasser für 60 Minuten mit anschließender Erholungsphase			
	Verhältnis Grundaktivität / Reiz	SD	Stimulationsort
Vorher (N=7)	3,86	1,46	Kopf
	8,57	1,91	Telson
	5,3	1,5	Schreitbeine
0-5 min (N=7)	2,6	0,2	Kopf
	6,3	1,22	Telson
	2,8	0,3	Schreitbeine
30 min (N=7)	3,6	3,56	Kopf
	7,6	5,04	Telson
	3,4	3,97	Schreitbeine
60 min (N=7)	2,3	0,53	Kopf
	6,3	3,22	Telson
	1,7	0,8	Schreitbeine
Erholung 10 min (N=5)	2,2	1,04	Kopf
	5,6	3,05	Telson
	1,7	0,5	Schreitbeine
Erholung 30 min (N=4)	2,3	0,61	Kopf
	5,2	2,17	Telson
	1,5	0,28	Schreitbeine
Erholung 60 min	2,9	2,9	Kopf
	9,6	9,6	Telson

(N=5)	2,7	2,7	Schreitbeine
-------	-----	-----	--------------

	Kleine Hummer	Große Hummer
Anzahl	5 mit Ableitung + 4 nur visuell beobachtet (einer direkt nachfolgend 100°C)	5 (alle direkt nachfolgend 100°)
Verhalten	Zunächst sehr aktiv, dann ruhiger	Zunächst sehr aktiv, dann ruhiger
Zeit bis „visuell tot“	14,2±5,3 min	37 ±17 min
Reizamplitude nach CO ₂	2,07±1,77	1,9 ±1,6
Visuelle Bewertung der Betäubung nach CO ₂	Komplett relaxiert	Komplett relaxiert
RWL nach CO ₂	Bei Kopf- und Schreitbeinstimulation nicht vorhanden, bei Stimulation des Telsons grenzwertig niedrig	Bei Kopf- und Schreitbeinstimulation nicht vorhanden, bei Stimulation des Telsons grenzwertig niedrig

	Verhältnis Grundaktivität / Reiz	SD	Stimulationsort
Vor CO ₂ (N=5)	12,45	9,9	Kopf
	7,17	2,76	Telson
	7,68	2,91	Schreitbeine
Nach CO ₂ (N=5)	1,78	1,27	Kopf
	2,58	1,9	Telson
	1,34	0,34	Schreitbeine
Amplitude nach CO ₂ relativ zu vorher	2,07	1,77	
Dauer der CO ₂ -Einwirkung	14,2 min	5,3	

Tabelle 9. Reizweiterleitung bei großen Hummern nach CO ₂ -Behandlung.			
	Verhältnis Grundaktivität / Reiz	SD	Stimulationsort
Vor CO ₂ (N=5)	3,15	1,95	Kopf
	5,1	5,72	Telson
	3,63	2,56	Schreitbeine
Nach CO ₂ (N=5)	1,00	0,075	Kopf
	2,047	0,91	Telson
	1,07	0,056	Schreitbeine
Amplitude nach CO ₂ relativ zu vorher	1,9	1,6	
Dauer der CO ₂ - Einwirkung	37	17	

	Kleine Hummer	Große Hummer
Anzahl	6	5
Visuelle Begutachtung nach EB	Tiere „tot“, liegen auf der Seite, keine Reflexe, keine Reaktionen	Tiere „tot“, liegen auf der Seite, keine Reflexe, keine Reaktionen
Reizweiterleitung	Direkt nach EB entweder nicht vorhanden oder aber aufgrund einer „epileptischen Phase“ nicht nachweisbar	Direkt nach EB nicht nachweisbar aufgrund einer „epileptischen Phase“.

	Verhältnis Grundaktivität / Reiz	SD	Stimulationsort
Vor EB (N=6)	11,61	9,5	Kopf
	3,87	0,75	Telson
	6,29	2,6	Schreitbeine
Direkt nach EB (N=6)	1,04	0,07	Kopf
	1,11	0,39	Telson
	0,79	0,12	Schreitbeine
Nach 30 min (N=4)	2,03	1,79	Kopf
	2,33	1	Telson
	1,46	0,47	Schreitbeine
Nach 60 min (N=4)	2,42	1,58	Kopf
	2,97	0,96	Telson
	2,06	0,91	Schreitbeine
Nach >2h (N=2)	9,63	12,22	Kopf
	4,53	2,04	Telson
	3,57	3,34	Schreitbeine

	Verhältnis Grundaktivität / Reiz	SD	
Vor EB (N=5)	8,2	5,8	Kopf
	14,7	16,1	Telson
	9,76	10,4	Schreitbeine
RWL direkt nach EB („epileptische Phase“) (N=5)	1,01	0,21	Kopf
	0,83	0,29	Telson
	0,63	0,25	Schreitbeine
Amplitude direkt nach EB (N=5)	22,5	24,7	Kopf
	19,11	22,7	Telson
	14,85	18,57	Schreitbeine

Tabelle 13. Übersicht über die in 100°C warmes Wasser überführten Tiere.			
Kohorte	auswertbar	Durchschnittliches Integral des Powerspektrums der ZNS-Aktivität 0-300 s nach Überführung für alle auswertbaren Tiere (relative Werte)	SD
Kleine Hummer 7°C	5 von 7	4787,2	2293,8
Kleine Hummer -1,8°C	7 von 8	4117,6	1701
Kleine Hummer EB	4 von 7	2841,5	509,4
Kleine Hummer MgCl ₂	1 von 2	2643,1	n/a
Kleine Hummer auf Eiswürfeln	1 von 1	3113,7	n/a
Kleine Hummer CO ₂	1 von 1	4196,5	n/a
Große Hummer 7°C	8 von 8	3504,4	1175
Große Hummer -1,8°C	10 von 10	4584,8	1929
Große Hummer EB	5 von 5	4219,4	1203
Große Hummer CO ₂	5 von 5	4743,85	945,3
Große Hummer tot (nach Präparation ü/N)	3 von 3	883,6	311
Großer Hummer tot / betäubt nach langsamer Erhitzung	1 von 1	14,62	n/a

Ic. Ergebnisse zum Berichtszeitraum 1.4.2014 – 31.12.2014

Bericht über Messungen mit dem kommerziellen Krebsbetäubungs- bzw. Tötungsgerät Crustastun™

Einleitung

Im ersten Teil des nun fast abgelaufenen Projekts wurde die Reizweiterleitung im Nervensystem von Crustaceen während des Erhitzens und der Abkühlung unter verschiedenen Betäubungsbedingungen untersucht. Es stand besonders die Elektrobetäubung im Focus der Messungen. Wir verwendeten antragsgemäß ein Gerät des LAVES (Vermittlung durch Prof. Steinhagen, Hannover), welches eine Einzelanfertigung ist. Es ist in der Lage, Ströme von bis zu 5 Ampere bei bis zu 100 Volt Gleichstrom bei frei einstellbaren Betäubungszeiten in eine Betäubungskammer zu liefern. Bei leitfähigeren Medien wie Salzwasser schaltet ein interner Überlastschutz bei zu hoher Leistung den Strom ab. Daher wurde bei den Betäubungsversuchen mit verdünntem Meerwasser gearbeitet. Es gibt auf dem Markt ein Gerät zur Elektrobetäubung von Krebsen mit dem Namen "Crustastun®", welches beträchtliche Unterschiede zu dem von uns im ersten Projektteil verwendeten Gerät aufweist. Dieses Gerät ist speziell für lebende Hummer und Taschenkrebse konzipiert. Dieses Gerät galt es während der beantragten Aufstockung/Verlängerung des Projekts zu testen.

Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen

Dieses Projekt soll eine Entscheidungshilfe für das BMELV liefern, wie aus neurobiologischer Sicht mit der Betäubung und Tötung von Krustentieren vorgegangen werden soll. Das neu zu überprüfende Gerät „Crustastun®“ wurde nachträglich in das Messprogramm aufgenommen.

Material und Methoden

Es wurden keine grundlegenden Veränderungen gegenüber der im Zwischenbericht vorgestellten bereits verwendeten experimentellen Methodik vorgenommen.

Um einen weiteren auswertbaren Parameter zur Verfügung zu haben, wurde begonnen, den Herzschlag von Krebsen zu messen. Dazu wurde nichtinvasiv ein auf der Reflexion von Infrarotlicht basierender Sensor verwendet (iSiPulse, iSiTec, Bremerhaven). Da dieser dorsal median über dem Herz angeordnet sein muss, wurde er bei den Tieren, die mit Crustastun behandelt wurden, für die Kontrollmessungen nur manuell an den Carapax gehalten und erst nach der Behandlung angeklebt. Daher ist nur die Frequenz des Herzschlags auswertbar. Weitere Parameter wie z.B. die Amplitude der Herzkontraktion sind aufgrund der

veränderten Lokalisation des Sensors nicht vergleichbar.

Im Zeitraum des Projekts war eine Auswertung sämtlicher Daten zeitlich bisher nicht möglich. Geplant ist, diese in eine Publikation der Ergebnisse einfließen zu lassen.

Während des Berichtszeitraums wurden folgende Anzahlen von Versuchstieren verwendet:

-36 große Hummer *Homarus americanus* (618,5±26,4g)

-58 Flusskrebse *Astacus leptodactylus* (54,5±6,5g)

-10 Taschenkrebse *Cancer pagurus* (4 davon für Präparationsübungen;
593,5±153,6g)

-40 Strandkrabben *Carcinus maenas* (20 davon für Präparationsübungen;
60,1±10,2g)

Beschreibung des Geräts „Crustastun“

Das Gerät wird vom Hersteller für die Betäubung bzw. Tötung von Hummern und Taschenkrebse und ähnlichen Tieren angeboten. Es verfügt über zwei Leistungsstufen, über welche die Behandlungsdauer auf entweder ca. 5 Sekunden bzw. ca. 10 Sekunden eingestellt wird. Eine Dauer von 5 Sekunden ist laut Herstellerangabe für Hummer gedacht, eine Dauer von 10 Sekunden für Taschenkrebse. Über die übrigen Parameter des Behandlungsstroms (Frequenz, Spannung, Ampere) liegen uns keine Informationen vor.

Im Inneren des rechteckigen Geräts befindet sich eine Wanne, welche ca. 12 Liter Wasser aufnehmen kann. In dieser sollen laut Herstellerangaben 65 g normales Kochsalz (NaCl) gelöst werden, um eine optimale Betäubung zu erreichen.

In der Wanne ist eine metallene Arbeitsfläche mittels Sprungfedern angebracht, auf der das zu betäubende Tier abgelegt wird. Die Wasseroberfläche reicht ungefähr an die Arbeitsfläche heran. Im Deckel des Geräts ist eine Elektrode eingebaut. Auf der Oberfläche der Elektrode wird mittels vier Haltern ein mit dem Wasser aus der Wanne getränkter Schwamm (32x23 cm) angebracht. Wird der Deckel geschlossen, drückt der Schwamm auf das Tier und drückt es zusammen mit der Arbeitsfläche in das Wasser des Betäubungsbeckens. Zwischen Schwamm und Wasseroberfläche bleibt dann ein ca. 1-2 cm breiter Luftspalt. Diese Anordnung bewirkt, dass der gesamte Strom bei der Betäubung durch das Tier fließen muss.

Das Elektrobetäubungsgerät Crustastun ist nicht für die Verwendung mit sehr kleinen Krebsen ausgelegt. Mehr als ein einzelnes Tier zurzeit ist nicht sinnvoll zu behandeln, da die Tiere nach Ablage auf der Arbeitsfläche des Geräts schnell den Rand erreichen können und in den Zwischenspalt zwischen Arbeitsfläche und Wasserreservoir fallen können. Ein vom Hersteller zusätzlich geliefertes grobes Drahtgitter zur Ablage auf der Arbeitsfläche kann dieses nur bedingt verhindern. Es

führt aber dazu, dass die Tiere etwas höher liegen und damit der Kontakt zur oberen Elektrode sichergestellt werden kann. Allerdings können die Tiere so unterschiedlich räumlich orientiert vom Strom durchflossen werden, was möglicherweise Auswirkungen auf die Betäubungswirkung haben könnte.

Während der Behandlung mit dem Gerät wurde der mit den Tieren verbundene Verstärker ausgekoppelt, um einen eventuell zerstörerischen Stromfluss in den Verstärker zu verhindern. Nachdem das Gerät Crustastun sich abgeschaltet hatte, wurde der Verstärker wieder eingekoppelt. Dadurch sind vor, während und nach der Behandlung mit Crustastun immer einige Sekunden ohne Mitschrift der Aktivität des Nervensystems.

Ergebnisse und Diskussion

Betäubungsversuche mit Crustastun an ausgewachsenen Hummern

Vor der Betäubung wurden die Tiere mechanisch stimuliert, um einen elektrophysiologischen Kontrollwert zu erhalten (Abb. 1A). Anschließend wurden sie entweder fünf oder 10 Sekunden lang mit Crustastun behandelt. Bei 21 von 26 Tieren wurden nach der Behandlung epileptische Phasen registriert (Abb. 1B, Tabelle 1), bei der eine um ein vielfaches angestiegene Aktivität des Nervensystems vorliegt. Diese Phase dauert etwa fünf bis fünfzehn Minuten (Abb.5A). Anschließend fällt die Aktivität weiter ab und erreicht nach 120 Minuten ein Minimum (länger wurde bei den Hummern am gleichen Tag nicht gemessen). Diese epileptische Phase ist mit der vergleichbar, welche bei dem Test des Elektrobetäubungsgeräts vom LAVES beschrieben wurde (s.o.).

Eine Reizweiterleitung RWL mechanischer Stimulationen ist in der frühen Phase meist nicht nachweisbar, kehrt aber oft bereits nach ca. 5 min. zurück (Abb. 1C) und ist nach einer Stunde sehr klar und deutlich vorhanden (Abb. 1D, Abb. 6A und 6B). Bei den Tieren, die mit Stufe 2 betäubt wurden, dauerte es länger, bis sich die RWL wieder einstellte.

Die Tiere wirken allerdings rein phänotypisch mehrere Stunden lang betäubt, bzw. tot. Sie sind zunächst einige Minuten lang starr bzw. verkrampft, dann relaxiert die Körpermuskulatur. Reflexe wie der Augenstielrückzugreflex (bei Berührung) sind nicht vorhanden; letzterer ist bei einigen Tieren nach 30-45 min. wieder leicht vorhanden. Die meisten Tiere überlebten die Behandlung, wobei die Letalität bei den mit Stufe 2 behandelten Tieren größer war. Bleibende Schäden konnten von uns nicht beobachtet werden, sind aber nicht auszuschließen.

Ausgehend von diesen Befunden kann angenommen werden, dass die Elektrobetäubung nicht nur auf die Nervenzellen wirkt, sondern in der Muskulatur einen Spasmus auslöst. Solche Spasmen sind bei der Verletzung eines Menschen

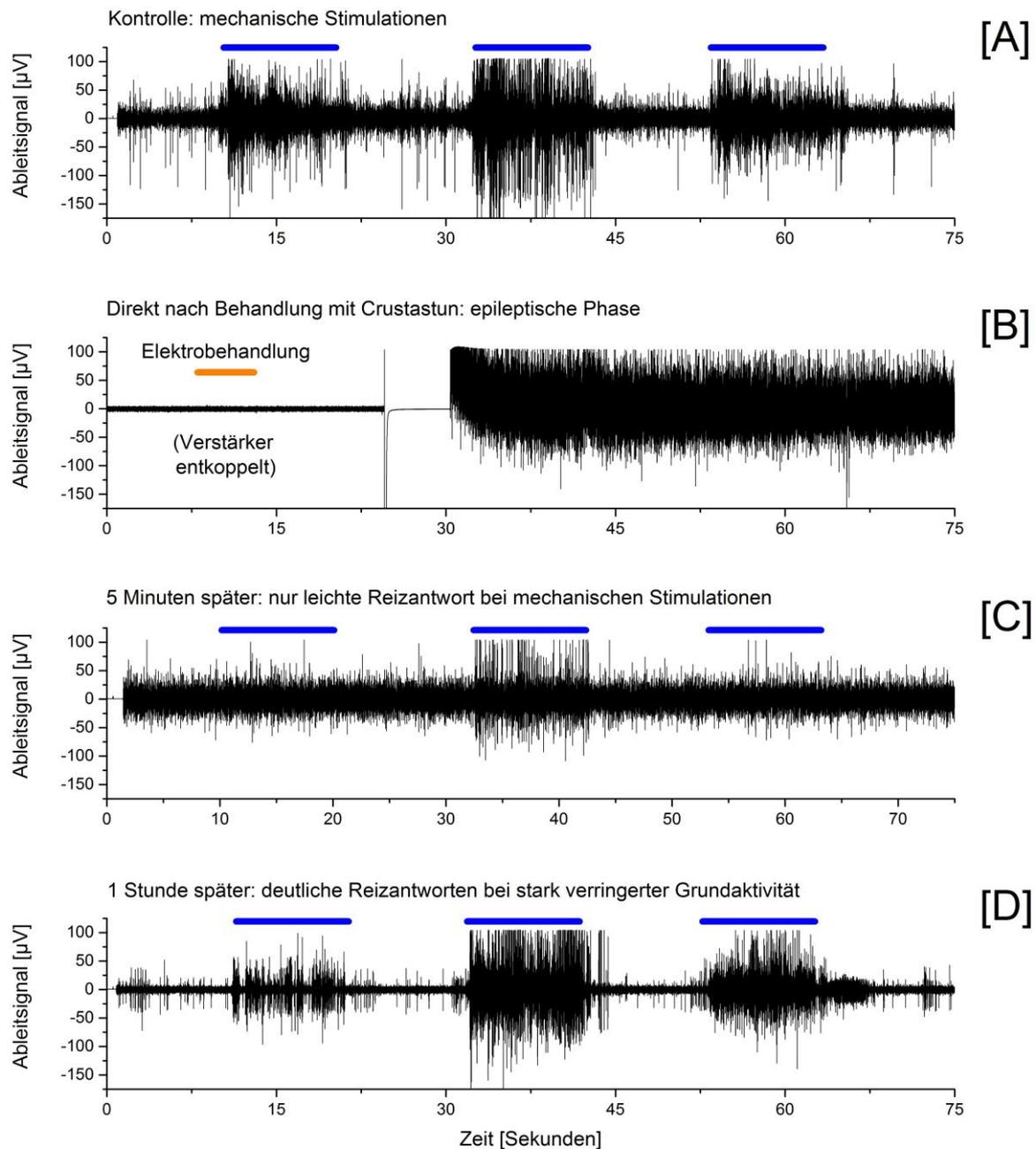


Abb. 1: Wirkung von Elektrobehandlung mit Crustastun auf die Reizweiterleitung bei Hummern. [A] Kontrolle vor der Behandlung. Es ist eine Grundaktivität vorhanden, welche bei mechanischer Stimulation (an Kopf, Telson und Schreitbeinen) eine deutliche reizkorrelierte Zunahme zeigt. [B] Während der Strombehandlung ist der Verstärker entkoppelt, um ihn vor Überlast zu schützen. Direkt nach Wiedereinkopplung ist eine Erhöhung der Aktivität zu registrieren. [C] Fünf Minuten nach Strombehandlung sind bei mechanischen Stimulationen meist keine oder nur leichte Antworten auf den Reiz zu verzeichnen. Die Grundaktivität des Nervensystems ist noch erhöht gegenüber der Ausgangssituation. [D] Nach einer Stunde sind deutliche Antworten auf Reize sichtbar. Die Grundaktivität des Nervensystems ist gegenüber der Ausgangssituation stark verringert.

durch Strom (neben möglichen Verbrennungen) ein Hauptgrund für einen möglichen tödlichen Ausgang eines solchen Ereignisses, da meist sowohl der Herzmuskel als auch die Lungenmuskulatur betroffen sind. Bei den Krebsen ist allerdings nach der Behandlung mit Crustastun ein Herzschlag in den meisten Fällen weiterhin registrierbar, wenn auch unregelmäßiger und mit Aussetzern. Der Herzschlag stabilisiert sich allerdings ähnlich schnell, wie die Reizweiterleitung wieder registrierbar ist (keine weiteren Daten in diesem Bericht präsentiert). Es kommt also zu einer Unterscheidbarkeit zwischen visueller Betrachtung („Tier tot“) und elektrophysiologischer Beobachtung („RWL vorhanden“).

Sollen Hummer in kochendes Wasser gegeben werden, ist in der Ableitung vom Nervensystem bereits bei der Handhabung der Tiere eine Aktivitätserhöhung feststellbar, die beim Kontakt mit den heißen Dämpfen über dem Kochtopf weiter ansteigt und manchmal begleitet wird mit leichten Fluchtreflexen, welche zu kurzzeitigen Überlastabschaltungen des Verstärkers führen können (Abb. 2A, 2B). Nach der Überführung in das kochende Wasser ist sofort eine teilweise starke Zunahme der Aktivität zu registrieren, die auch noch weiter ansteigen kann und ein bis zwei Minuten anhält.

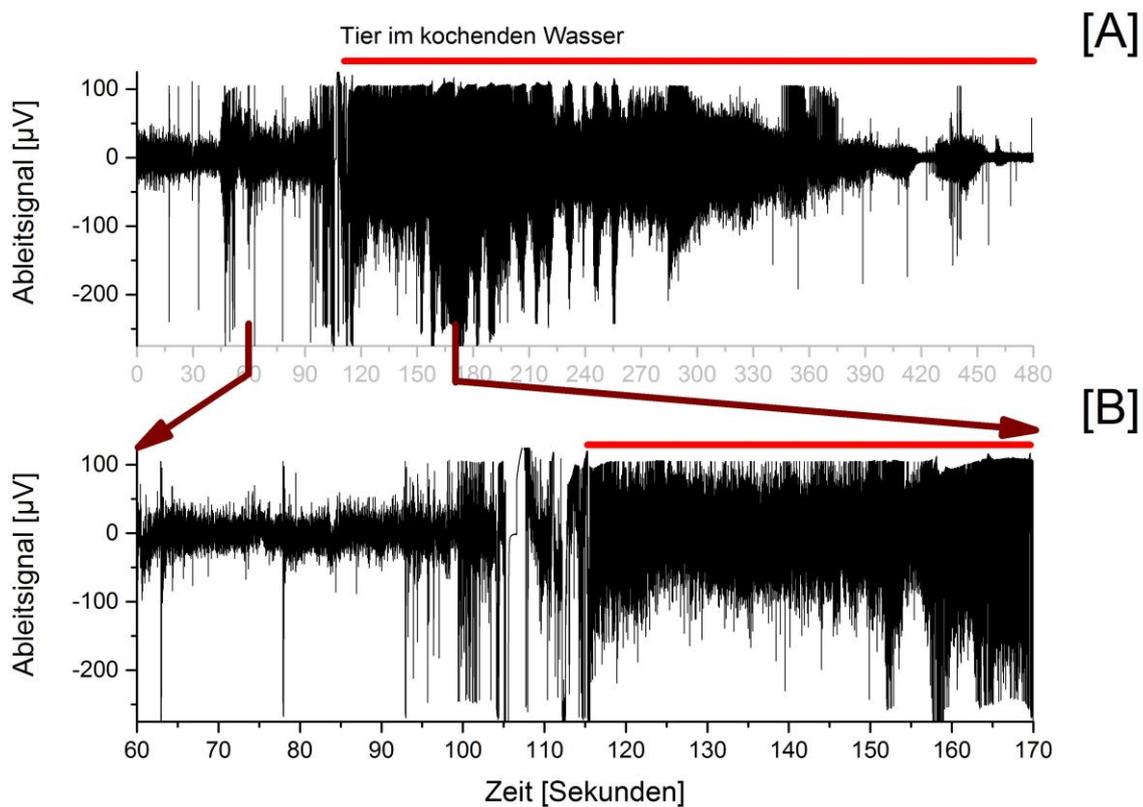
Mit Crustastun behandelte Hummer zeigen einen anderen Verlauf der Messungen. Wenn Tiere während der ersten 1 bis 5 Minuten nach Elektrobetäubung in kochendes Wasser gegeben werden (Abb. 2C, 2D), lässt sich ein Effekt beobachten, der in ähnlicher aber schwächerer Form bei anderen getesteten Betäubungsmethoden schon registriert wurde. Bei ihnen ist zunächst keine Aktivitätserhöhung beim Transfer ins heiße Wasser sichtbar, es ist im Gegenteil sogar eine weitere Abnahme der vorhandenen Aktivität (von der epileptischen Phase herrührend) sichtbar. Mit einer Verzögerung von 15-20 Sekunden kommt es dann erst zu einem Anstieg in der Aktivität, welcher unterschiedlich stark ausfallen kann.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass im Ableitsignal (mindestens) zwei unterschiedliche Aktivitäten registriert werden:

- (1) normale Aktivität der Nervenzellen im normalen Temperaturbereich
- (2) abnormale Aktivität der Nervenzellen (und des umgebenden Gewebes?) durch Temperaturerhöhung jenseits des Toleranzbereichs (Zerstörung der Zellintegrität durch den Kochvorgang ab ca. 30°C).

Der zunächst fehlende Anstieg der Aktivität wäre dann auf die fehlende RWL oder eine Paralyse der Sensorik zurückzuführen, und der darauf folgende Anstieg der elektrischen Signale auf die Temperaturerhöhung oberhalb des Vitalitätsbereichs. Eine Messung an Tieren mit implantierten Temperatursensoren könnte Aufschluss geben, wann an der Ableitstelle und generell im Nervensystem letale Temperaturen erreicht werden. [Von uns diesbezüglich an toten Hummern durchgeführte Messungen zeigen eine zeitliche

Hummer im kochenden Wasser



Mit Crustastun behandelter Hummer im kochenden Wasser

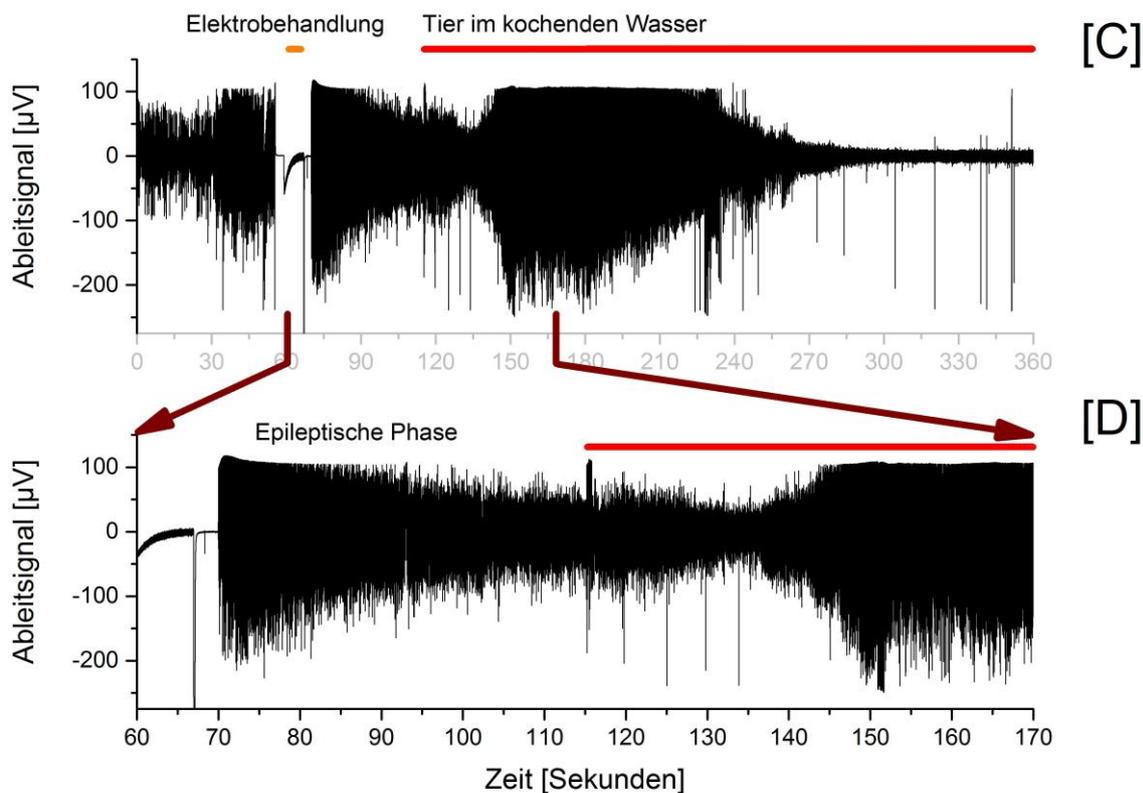


Abb. 2: Überführung eines Hummers in kochendes Wasser. [A] Im Signal dieses Hummers ist zunächst Grundaktivität zu sehen (0-45 Sekunden). Die Handhabung des Tieres vor und

Fortsetzung Abb. 2. während der Überführung in den Kochtopf führt zu einer Aktivitätserhöhung (30-115 Sekunden). Einige leichte Schwanzfächerschläge des Tieres führen zu kurzen Aussetzern des Verstärkers (105-115 Sekunden). Nach Überführung in das kochende Wasser (bei Zeitindex 115 Sekunden) ist eine erhöhte Aktivität feststellbar. Während des Kochvorgangs sind bei diesem Tier relativ lange Aktivitäten messbar; der definierte physiologische Nullpunkt wird erst bei Zeitindex 280 Sekunden erreicht. [B] Ausschnitt aus [A]. [C] Aufzeichnung eines vor der Überführung in kochendes Wasser mit Crustastun behandelten Hummers. Zunächst ist Grundaktivität zu sehen (0-30 Sekunden), dann wird der Verstärker entkoppelt, um ihn vor Schäden zu schützen. In dieser Phase wird das Tier betäubt. Anschließend ist eine erhöhte Aktivität „Epileptische Phase“) sichtbar, die exponentiell abfällt. Das Tier wird ebenfalls bei Zeitindex 115 Sekunden in kochendes Wasser überführt. Es ist zunächst keine Aktivitätserhöhung sichtbar, diese tritt erst mit einer Verzögerung von 20 ca. Sekunden ein. [D] Ausschnitt aus [C].

Korrelation zwischen Temperaturanstieg und elektrischer Aktivität.] Die Dauer der registrierten Aktivität ist nicht signifikant unterschiedlich zu den anderen getesteten Betäubungsmethoden in kochendem Wasser (Tabelle 2). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass mit der verwendeten elektrophysiologischen Methode sowohl normale Signale der Nervenzellen als auch Signale von sterbenden Zellen registriert werden.

Während des Kochvorgangs waren bei 10 von 16 Hummern noch kräftige Zuckungen der Scheren, der Beine und des Abdomens visuell beobachtbar, allerdings bei den mit Stufe 2 betäubten Tieren seltener als bei den mit Stufe 1 betäubten (Tabelle 1).

Betäubungsversuche mit Crustastun an Flusskrebse

Die Flusskrebse wurden wie die Hummer auch vor der Behandlung untersucht, um einen Kontrollwert zu erhalten (Abb. 3A). Phänotypisch zeigt sich nach der Elektrobetäubung ein ähnliches Bild wie bei den Hummern: Die Tiere sind mehrere Stunden lang paralysiert und erlangen erst langsam ihre Beweglichkeit zurück. Anders als erwartet, tötet das Gerät die Tiere meistens nicht (Tabelle 4), obwohl es für diese kleinen Tiere überdimensioniert erscheint. Bei Tieren, die 5 Sekunden lang behandelt wurden, sind nach Erholung keine bleibenden Schäden erkennbar. Dieses wurde aber nicht weitergehend ethologisch untersucht. Bei Tieren, die 10 Sekunden lang behandelt wurden, sind nach der Erholungsphase dauerhafte Schäden erkennbar. Diese Tiere können zwar noch lokomotorisch aktiv sein, sitzen aber meist lethargisch auf einer Stelle und reagieren nur bedingt auf Reize. Offensichtlich ist es zu massiven Schädigungen gekommen.

Anders als bei den Hummern sind in den Ableitsignalen zwei unterschiedliche Aktivitätsverläufe zu beobachten, einmal mit und einmal ohne epileptische Phase. Dieses könnte davon herrühren, dass die Tiere in dem für sie eigentlich zu großen Gerät unterschiedlich ausgerichtet liegen und der Strom durch unterschiedliche Bereiche des Tieres fließt.

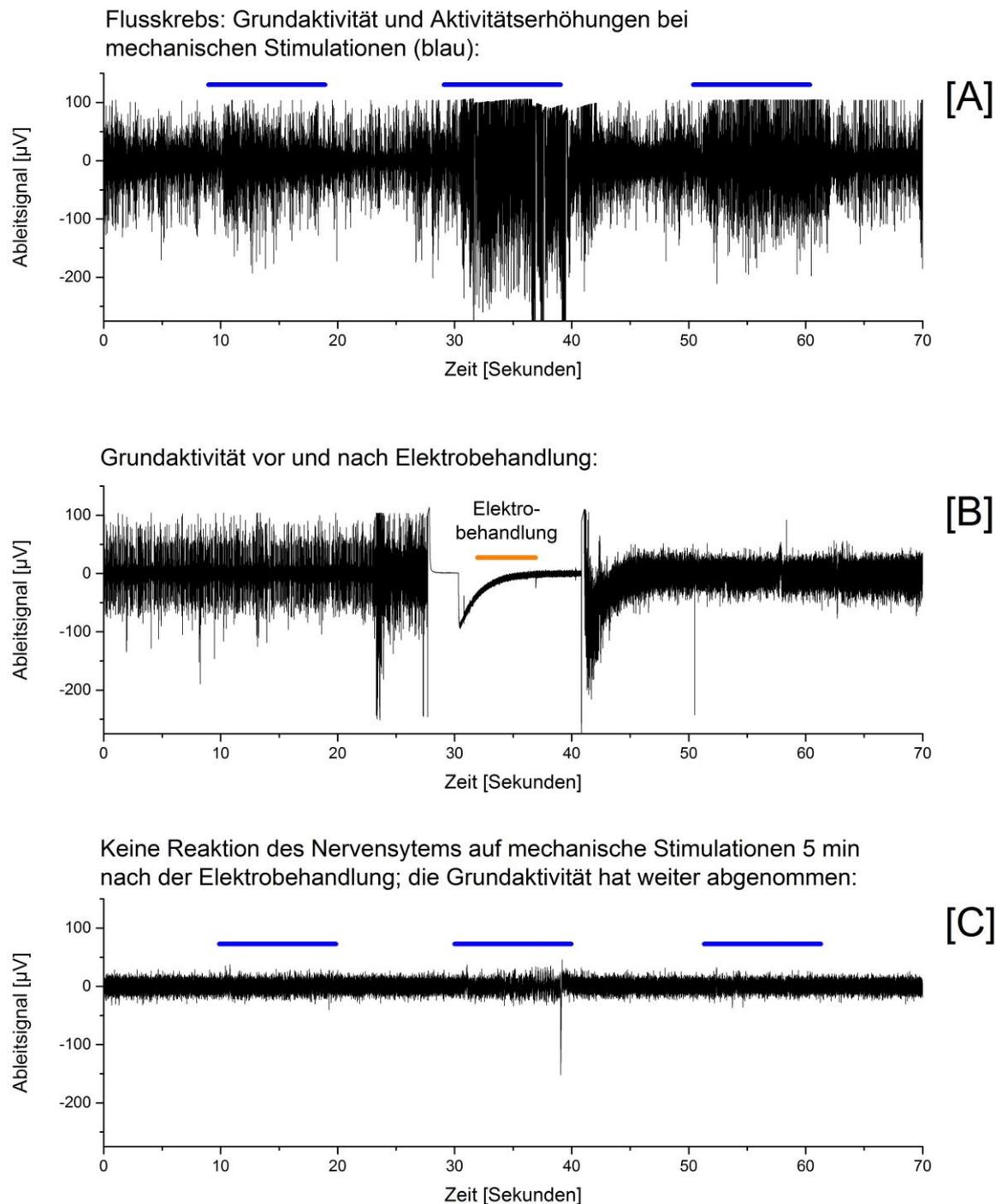


Abb. 3: Wirkung von Elektrobehandlung mit Crustastun auf die Reizweiterleitung bei Flusskrebse. [A] Kontrolle vor der Betäubung. Die vorhandene hohe Aktivität zeigt eine deutliche Zunahme bei mechanischer Stimulation (an Kopf, Telson und Schreitbeinen). [B] Der Verstärker wird vor der Behandlung entkoppelt, um ihn vor Spannungsschäden zu schützen. Direkt nach dessen Wiedereinkoppelung ist eine verringerte Aktivität zu erkennen. [C] Nach fünf Minuten sind bei mechanischen Stimulationen meist keine oder nur leichte Antworten auf die Reize zu verzeichnen. Die Grundaktivität des Nervensystems hat sich weiter verringert.

Bei drei Tieren war ein Verlauf ähnlich wie bei den Hummern feststellbar: es gab zunächst eine epileptische Phase, und nach Überführung in kochendes Wasser kam es erst mit einer Verzögerung zu einem stärkeren Anstieg der Aktivität. Bei den meisten übrigen Tieren hingegen war keine epileptische Phase erkennbar; die Aktivität war ungefähr gleichstark oder niedriger als vor der Behandlung. Diese Grundaktivität nahm ähnlich zu den Hummern mit der Zeit ab (Abb. 3B, 3C) und erreichte nach ca. 1-2 h ein Minimum (Abb. 5B). Eine Reizweiterleitung direkt nach der Elektrobehandlung ist in den seltensten Fällen gegeben und auch nach 5 Minuten bei vielen Tieren nicht nachweisbar (Abb. 3C, 6C), nach 10-15 Minuten ist sie bei den meisten Tieren wieder feststellbar.

Wie bei den Hummern ist bei unbehandelten Flusskrebsen beim Transfer zum Kochtopf und nach Überführung in das kochende Wasser eine starke Aktivitätserhöhung feststellbar (Abb. 4A). Bei der Überführung der behandelten Tiere in kochendes Wasser ist hingegen nur in Ausnahmefällen ein stärkerer Anstieg erkennbar.

In vielen Fällen gibt es bei den behandelten Tieren nur einen sehr leichten Anstieg, welcher verzögert auftritt (Abb. 4B) und gegenüber den Kontrolltieren schwächer ausfällt (Tab. 2). Der Anstieg dürfte auf den reinen Kochvorgang zurückführbar sein. Dies wäre dann ein Hinweis darauf, dass die Elektrobehandlung bei Flusskrebsen erfolgreich ist.

Von den acht präparierten Tieren, deren Langzeiterholung nach der Elektrobehandlung (Stufe 1) untersucht wurde, überlebten zwei Tiere nicht bis zum folgenden Tag (Tab. 4). 20 nicht präparierte Tiere wurden mit Crustastun behandelt, je 10 mit Stufe 1 und 2. In beiden Gruppen überlebten je 9 Tiere und verstarb je 1 Tier. Die Tiere, welche 10 Sekunden lang behandelt wurden, wiesen nach der Erholungsphase gegenüber den kürzer behandelten Tieren deutliche Verhaltensänderungen auf. Sie waren lethargisch und reagierten kaum auf äußere Stimuli.

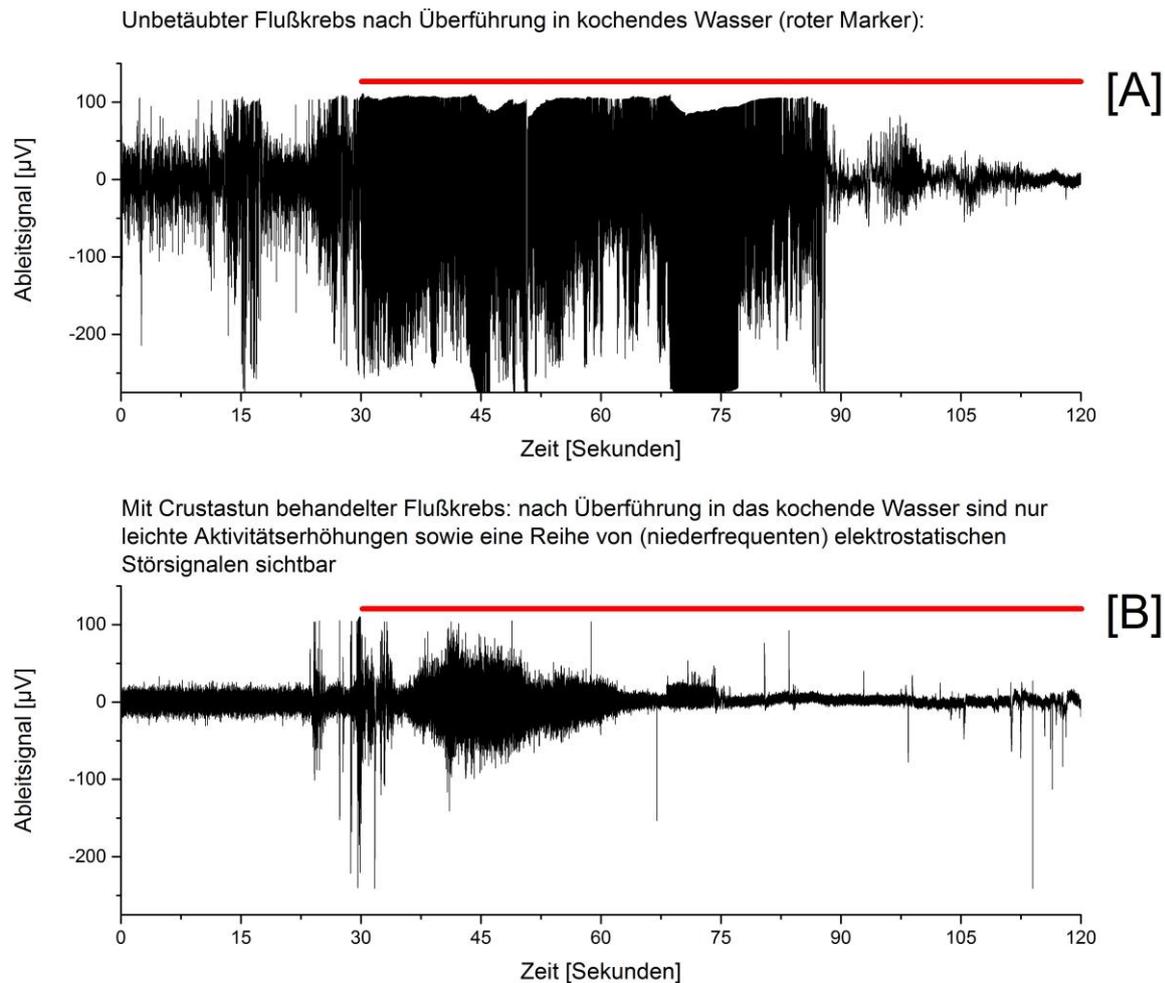


Abb. 4: Vergleich eines [A] unbetäubten Flusskrebsses und [B] eines mit Crustastun behandelten Flusskrebsses nach Überführung in kochendes Wasser. Bei dem unbetäubten Tier sind starke Aktivitäten sowohl beim (manuellen) Transfer aus dem Aquarium in den Kochtopf als auch anschließend im kochenden Wasser erkennbar. Bei dem betäubten Tier sind bei der Handhabung des Tieres nur einige (niederfrequente) Störungen zu registrieren. Im weiteren Verlauf des Kochvorgangs ist in diesem Fall eine leichte Aktivitätserhöhung festzustellen. Diese kann bei anderen Tieren stärker oder schwächer ausfallen. Bei ca. 75 Sekunden ist eine Salve („burst“) erkennbar, die aus gleichförmigen hochrepetitiven Signalen besteht. Die anschließend sichtbaren Schwankungen des Ableitsignals sind niederfrequenter Natur und entstehen durch den Kochvorgang: Die Tiere beginnen nach einer bestimmten Kochzeit, an die Wasseroberfläche zu treiben. Die niederfrequenten Signale scheinen von diesen Bewegungen herzurühren.

Betäubungsversuche mit Crustastun an Taschenkrebsen und Strandkrabben

Eine Implantierung von Elektroden gelang bei diesen Tieren nicht. Daher wurden 6 Taschenkrebse mit Crustastun Stufe 2 sowie jeweils 10 Strandkrabben mit Crustastun Stufe 1 und Stufe 2, betäubt und rein visuell begutachtet. Dabei zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie bei den Hummern und Flusskrebsen, was Erholungszeiten sowie dauerhafte Schädigungen betrifft. Die dauerhaften Schädigungen waren allerdings wesentlich ausgeprägter.

3 der 6 Taschenkrebse erholten sich überhaupt nicht, sondern verstarben (Tab. 4). Die drei überlebenden Taschenkrebse wiesen massive Verhaltensänderungen auf. Bis auf leichte Bewegungen der Körperanhänge waren äußerlich kaum Lebensäußerungen registrierbar, der Herzschlag war allerdings regelmäßig.

Von den Strandkrabben überlebten 9 Tiere nach Betäubung Stufe 1 und 5 Tiere nach Betäubung Stufe 2 (Tab. 4). Sie waren ca. 30 Minuten lang starr, danach relaxierte die Muskulatur, und bis auf den regelmäßigen Herzschlag und sporadische Zuckungen waren mehrere Stunden lang keine Lebensäußerungen feststellbar, wobei sich die Stufe 1 betäubten Tiere schneller erholten. Die mit Stufe 1 behandelten Tiere schienen mehrheitlich kaum beeinträchtigt zu sein, die mit Stufe 2 behandelten Tiere wiesen wie die Flusskrebse deutliche Verhaltensänderungen auf.

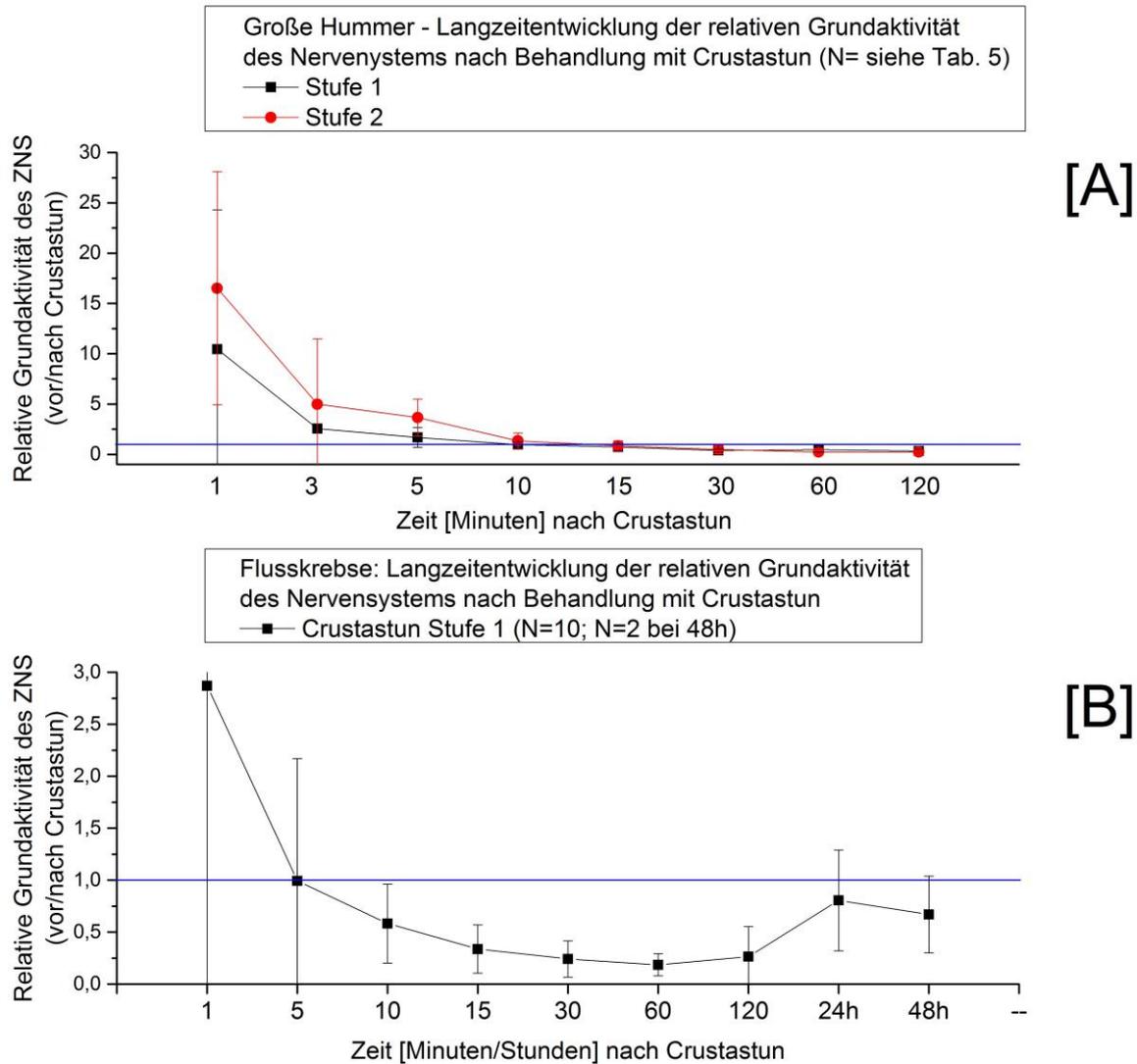


Abb. 5: Die relative Grundaktivität des Nervensystems vor und nach der Betäubung mit Crustastun bei Hummern [A] und Flusskrebsen [B]. Bei den Hummern ist im Anschluss an die Betäubung eine teilweise starke Erhöhung des Ableitsignals zu registrieren. Diese von uns „epileptische Phase“ bezeichnete Aktivität fällt in ca. 5-10 Minuten auf ein mit dem Ausgangswert vergleichbares Niveau ab. Anschließend sinkt die Aktivität allerdings weiter ab. Bei den Flusskrebsen ist nur in 3 von 15 Fällen solch eine epileptische Phase vorhanden, die übrigen Tiere zeigen ein gleiches oder erniedrigtes Aktivitätsniveau nach der Betäubung. Die Aktivität sinkt wie bei den Hummern ab und erreicht nach ca. 60 bis 120 Minuten ein Minimum. Bei den überlebenden Tieren steigt die Grundaktivität in den folgenden zwei Tagen fast auf das Ausgangsniveau zurück an. Die blauen Linien symbolisieren den Wert „1“, bei dem das Verhältnis der Grundaktivität vor und nach der Betäubung eins beträgt, das Aktivitätsniveau also gleich groß ist.

Betäubung bzw. Tötung von Krebsen durch langsame Erwärmung des Hälterungswassers

Wie schon im vorherigen Bericht erwähnt, haben wir eine langsame Erwärmung von Krebsen (an 3 Hummern und 7 Flusskrebse) vorgenommen, um zu überprüfen, ob es sich hierbei um eine alternative Betäubungs- bzw. Tötungsmethode handeln könnte. Es gibt die Überlegung, dass verschiedene aquatische bzw. amphibische Tierarten bei langsamer Erwärmung diese nicht registrieren können, wohingegen sie auf eine abrupte starke Temperaturänderung reagieren. Daher wurden die Tiere von Hälterungstemperatur (ca. 7,5°C) kontinuierlich (ca. +1°C pro Minute) erwärmt bis keinerlei Reizweiterleitung mehr feststellbar und die Grundaktivität im Nervensystem stark abgesunken war. Dies war bei 35-40°C der Fall. Anschließend wurden die Tiere in kochendes Wasser überführt. Das Verhalten der Tiere in diesen Experimenten wurde beobachtet, protokolliert und zusätzlich dabei aber die Grundaktivität des Nervensystems und die Reizweiterleitung gemessen. Bei einigen Tieren wurde auch der Herzschlag aufgezeichnet.

Beschreibung des Verhaltens der Tiere sowie der physiologischen Parameter bei langsamer Erwärmung

Bei Hälterungstemperatur sind die Hummer und Flusskrebse meist relativ ruhig und zeigen nur sporadisch Aktivitäten. Bei ansteigender Umgebungstemperatur werden die Tiere aktiver und bewegen ihre Gliedmaßen öfter spontan. Bei Stimulierung zeigen die Tiere bis ca. 15°- 20°C Umgebungstemperatur noch normale Verhaltensweisen: sie heben die geöffneten Scheren an und zeigen Abwehrverhalten, schlagen das Telson unter das Abdomen ein, ziehen die Augentiele in die Augenhöhlen zurück („Augentielrückzugreflex“ AR), bewegen die Schreitbeine vom Stimulus weg. Wenn die Temperatur weiter ansteigt, werden die Tiere träge und zeigen weniger Reaktionsbereitschaft. Der AR wird immer schwerer auslösbar und ist bei den meisten Tieren ab 27,5°-30°C nicht mehr vorhanden. Ab 35°C sind die Augentiele oftmals dauerhaft komplett zurückgezogen. Das Abdomen hängt ab 25°C oft zunächst relaxiert herunter und wird nicht mehr bewegt; bei weiterem Temperaturanstieg dann aber eingeschlagen und starr (Verkrampfung der Muskulatur?). Die Scheren können zuerst nicht mehr angehoben werden und dann auch nicht mehr (herabhängend) bewegt werden. Der Herzschlag steigt bis 25°C an, zeigt dann längere Aussetzer und wird immer unregelmäßiger, der Puls geht stark zurück, bis er ab ca. 30°C meist nicht mehr nachweisbar ist.

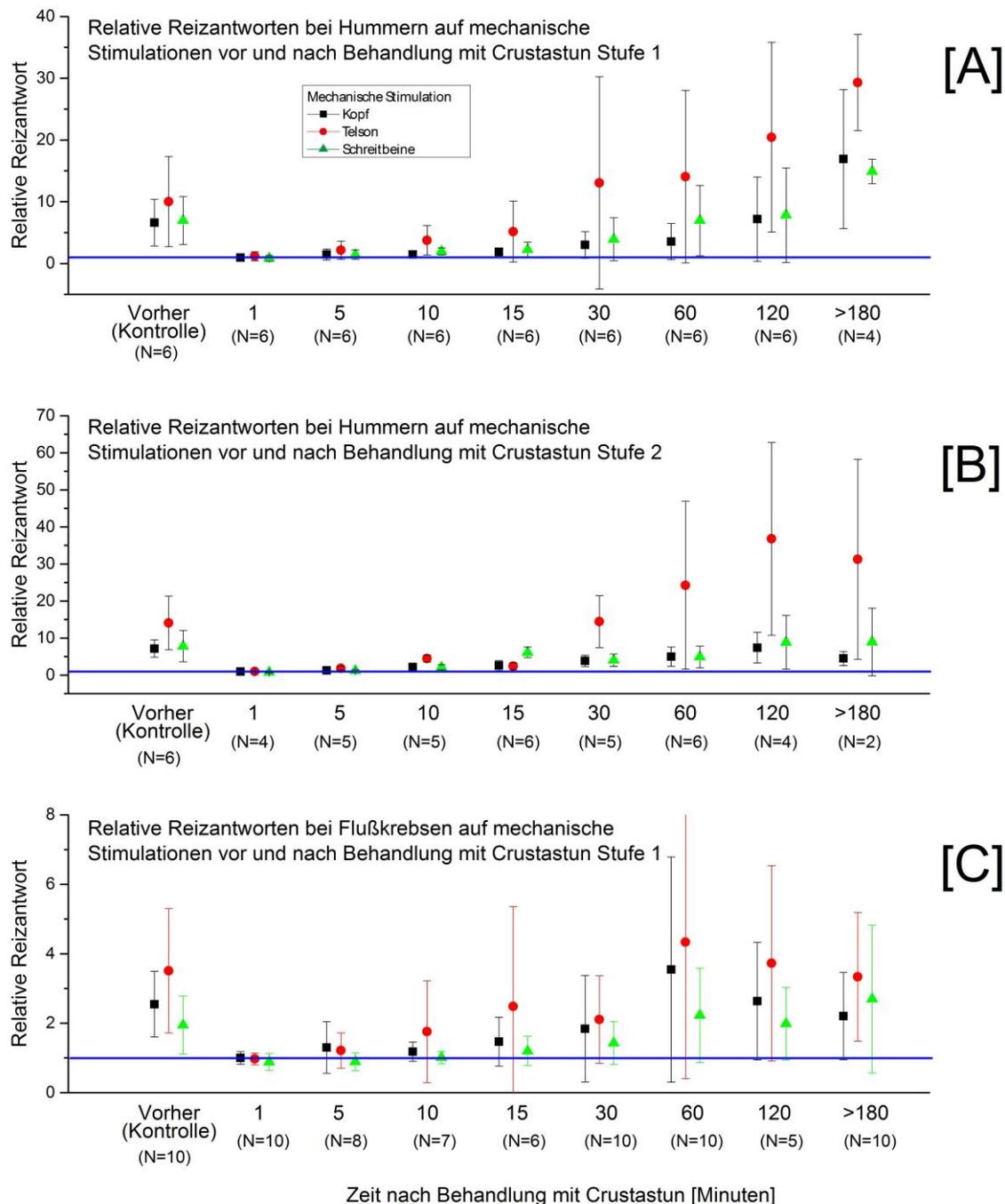


Abb. 6: Relative Reizantworten (vor/während Reiz) auf mechanische Stimulationen an Kopf, Telson und Schreitbeinen vor und nach Behandlung mit Crustastun während der Langzeiterholung von Hummern ([A] Stufe 1 und [B] Stufe 2) sowie Flusskrebse ([C] nur Stufe 1). Die blauen horizontalen Linien symbolisieren den Wert 1, bei welchem kein Unterschied zwischen Grundaktivität und Reizantwort feststellbar ist und damit laut Definition keine Reizweiterleitung vorliegt. [A] Hummer nach Behandlung mit Crustastun Stufe 1. Die RWL erholt sich bei Reizung des Telsons schneller als bei den anderen beiden Reizorten. [B] Hummer nach Behandlung mit Crustastun Stufe 2. Die Erholung erfolgt langsamer als bei den mit Stufe 1 behandelten Tieren. [C] Flusskrebse nach Behandlung mit Crustastun Stufe 1 (Stufe 2 wurde nicht auf Langzeiterholung hin getestet). Die Flusskrebse scheinen sich schneller als die Hummer von der Elektrobehandlung zu erholen. Bei allen drei Kohorten ist die RWL direkt nach der Elektrobehandlung nicht vorhanden, erholt sich allerdings unterschiedlich schnell. Nach Erholung der Tiere ist die relative Reizantwort oftmals stärker als vor der Behandlung mit Crustastun. (Die Grundaktivität des ZNS ist allerdings zu den Zeitpunkten noch verringert, vergleiche Abbildung 4 und Abbildung 1D.)

Die Grundaktivität des ZNS steigt bei Hummern bis ca. 25°C an (Abb. 7A), bei Flusskrebse nur bis ca. 17,5°C (Abb. 7B). Anschließend sinkt sie langsam ab, bis sie ab 35°C bis 40°C den definierten physiologischen Nullwert erreicht. Bei diesen hohen Temperaturen treten oftmals elektrophysiologische „bursts“, kurze hohe Aktivität, auf die dann längere Phasen ohne jegliche Aktivität folgen. Durch diese bursts erscheint das Absinken der Grundaktivität verlängert. Auch wenn die Grundaktivität des ZNS lange hoch erscheint und höher ist als die Ausgangsaktivität bei Hälterungstemperatur, ist die RWL oftmals schon stark eingeschränkt (Abb. 7B, 8B). Die RWL zeigt das größte Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei Hälterungstemperatur; dieses wird bei ansteigender Temperatur immer kleiner. Die Signalzusammensetzung der Grundaktivität verändert sich dahingehend, so dass keine individuellen Aktivitäten von Nervenzellen mehr unterscheidbar sind sondern ein einheitliches Rauschen („noise“) messbar wird, welches von oben genannten kurzen bursts unterbrochen wird.

Bei Entnahme der Tiere aus dem warmen Wasser und ihrer Überführung in kochendes Wasser traten bei den meisten Tieren hochfrequente Störsignale auf, die eine Auswertung erschwerten und in den meisten Fällen verhinderten. Zwischen den Störsignalen waren aber teilweise kurze Abschnitte sichtbar, die den normalen Verlauf der Kurven darstellen dürften.

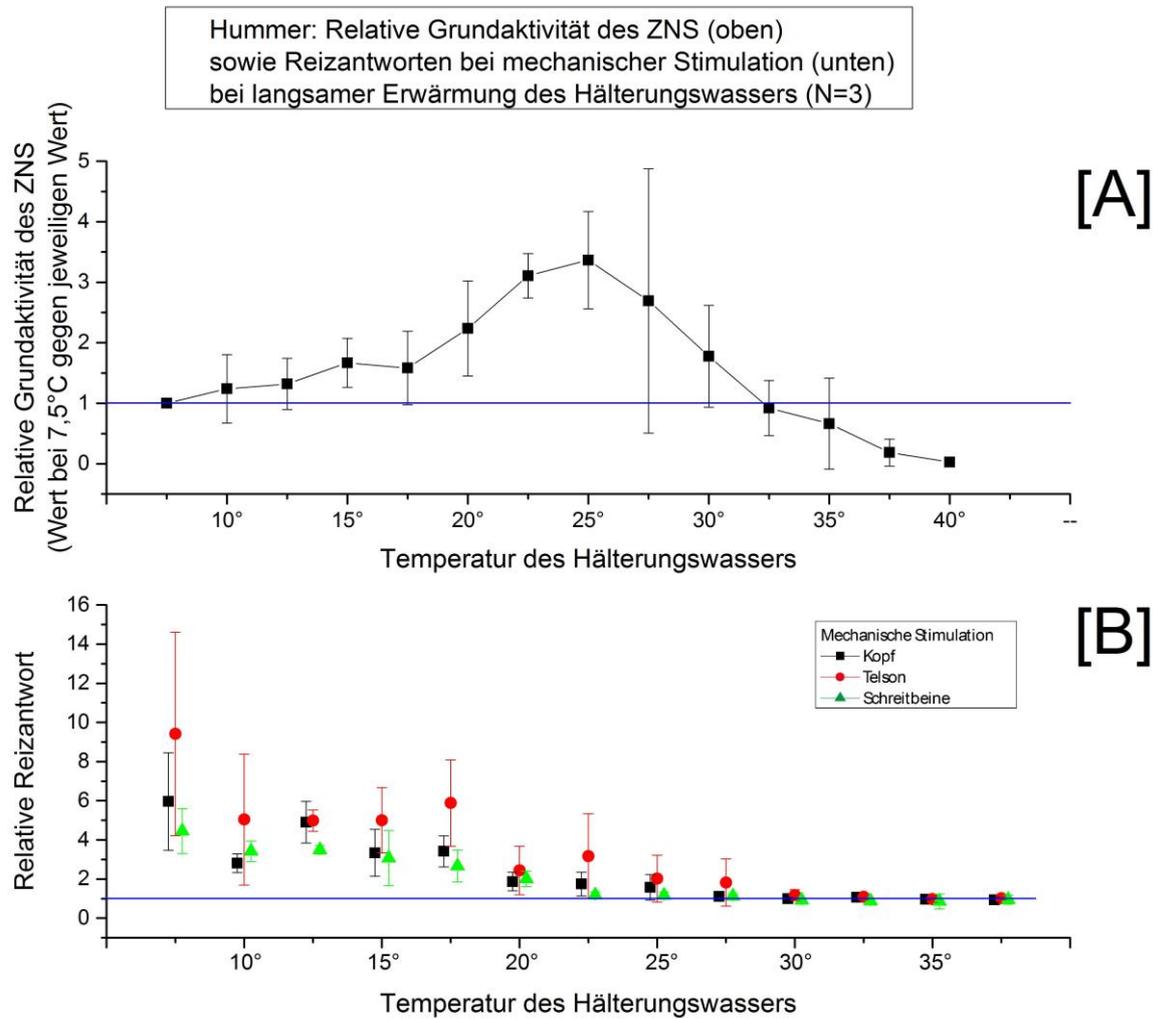


Abb. 7: Die Grundaktivität des Nervensystems [A] steigt bei Hummern bis ca. 25°C an, um anschließend abzufallen, bis das Tier tot ist. Die relative Reizweiterleitung steigt hingegen nicht an [B], sondern hat bei der Ausgangstemperatur das größte Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Ab einer Temperatur von 25-27,5°C ist nur noch eine sehr schwache Reizweiterleitung feststellbar, ab 30°C ist sie nicht mehr vorhanden.

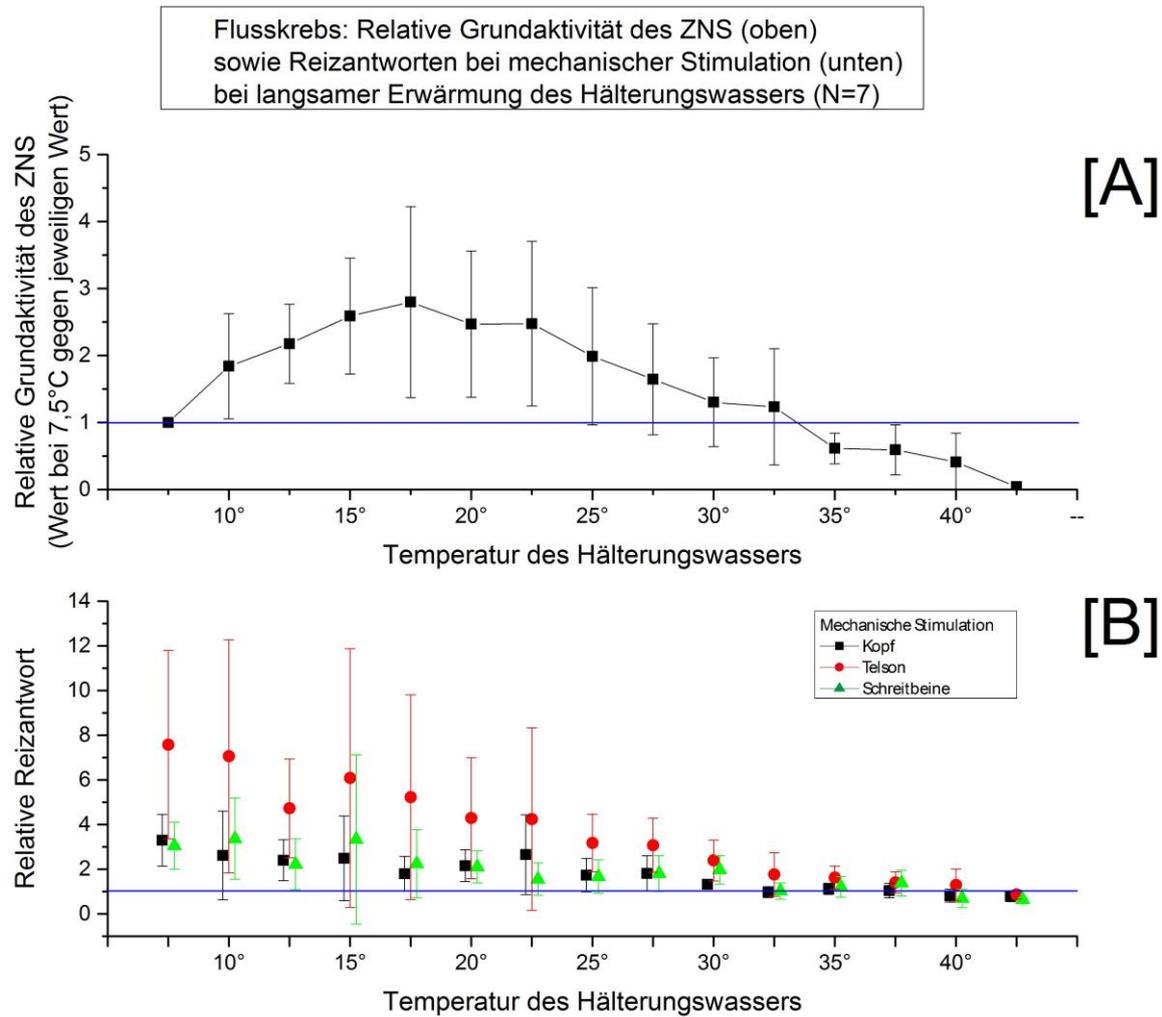


Abb. 8: Bei Flusskrebsen steigt die relative Grundaktivität [A] bei langsamer Erwärmung bis 17,5°C an, um anschließend langsam wieder abzufallen. Das Ausgangsniveau wird erst bei ca. 32,5-35°C wieder erreicht. Die relative Reizantwort [B] ist bis ca. 17,5°C relativ stabil und nimmt dann ab. Ab ca. 32,5°C ist bei den meisten Tieren keine Reizweiterleitung mehr vorhanden.

Fazit und Zusammenfassung Ic

Fazit:

Die Ergebnisse der Elektrobehandlung von Hummern und Flusskrebse mit dem „Crustastun“ Gerät ähneln den Resultaten, welche mit dem Gerät vom LAVES im vorherigen Antragszeitraum erzielt wurden. Bei Hummern kommt es zu einer „epileptischen Phase“, die von außen bei den vollständig paralysierten Tieren nicht zu erkennen ist und während der die Reizweiterleitung durch die dauernde Nervenaktivität vollständig überlagert ist. Das Gerät Crustastun ist für größere Tiere als Flusskrebse ausgelegt und die Behandlung kann sich sehr unterschiedlich auswirken. Flusskrebse zeigen jedoch meist keine epileptischen Phase und keine Reizweiterleitung nach Behandlung.

Zusammenfassung:

Phänotypisch sind die Tiere durch den Stromfluss paralysiert und es dauert oftmals mehrere Stunden, bis sie die Kontrolle über ihre Muskulatur wiedererlangen. Teilweise sind anschließend aber massive Verhaltensänderungen beobachtbar, die auf Schädigungen durch die Elektrobetäubung hinweisen.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen, die in dieser Art zum ersten Mal bei Wirbellosen durchgeführt wurden, zeigen Unterschiede in der Aktivität des Nervensystems zwischen Hummern und Flusskrebse. Die Hummer zeigen, wie auch bei der Behandlung mit dem LAVES Gerät, im Anschluss an die Elektrobetäubung eine epileptische Phase, die 10 Minuten und länger anhalten kann. Dabei fällt die Aktivität, die zu Beginn ein Vielfaches der Grundaktivität des Nervensystems betragen kann, langsam ab und sinkt oftmals auf ein viel niedrigeres Niveau, als es vor der Behandlung gegeben war. Solche „epileptischen Phasen“ sind von allen Elektrobetäubungs-Versuchen wie z.B. bei Fischen, Hühnern oder Schafen bekannt.

Werden die Hummer in der akuten Phase des epileptischen Anfalls (Aktivität höher als die Grundaktivität) stimuliert, kommt es nur in Ausnahmefällen zu einer Reizweiterleitung (RWL) im Nervensystem; bei den meisten Tieren ist jedoch keine RWL nachweisbar. Während des Abflachens der Nervensystemaktivität ist eine relativ schnelle Erholung der RWL gegeben. Dies bedeutet, dass es einen Unterschied zwischen dem visuellen Habitus der Tiere („betäubt“) und der Aktivität des Nervensystems („Reizweiterleitung vorhanden“) gibt.

Bei Überführung der Hummer in kochendes Wasser ist sowohl bei der Handhabung der mit Crustastun behandelten Tiere als auch direkt im Anschluss nach Gabe in das Wasser keine sofortige Aktivitätserhöhung feststellbar, wie das bei den Kontrolltieren der Fall ist. Die vom epileptischen Anfall herrührende Aktivität fällt noch ca. 10-20 Sekunden lang weiter ab und es kommt erst dann zu einer Erhöhung des elektrophysiologischen Signals. Diese Signale werden wahrscheinlich vom Kochvorgang selbst herbeigeführt. Fluchreflexe wurden in keinem Fall beobachtet.

Bei den behandelten Flusskrebse ist im Normalfall keine epileptische Phase nachweisbar, und bei Überführung in das kochende Wasser sind nur verzögert leichte Aktivitätserhöhungen zu registrieren, welche wesentlich schwächer sind als bei den Kontrolltieren. Einige Ausnahmen hiervon dürften darauf zurückzuführen sein, dass das Gerät Crustastun für wesentlich größere Tiere ausgelegt ist, so dass der Stromfluss durch unterschiedliche Körperregionen laufen dürfte.

Analog zu den Verhältnissen bei Wirbeltieren kann davon ausgegangen werden, dass die Krebse während der epileptischen Phase keine zentralnervöse Verarbeitung von Umwelt- und somatischen Reizen leisten können.

Anhang: Tabellen

Tabelle 1: Auswertung Elektrobehandlung von Hummern und Flusskrebse mit Gerät „Crustastun“								
	„Epileptische Phase“ nach Behandlung mit Crustastun im Nervensystem			Aktivität nach Überführung in 100°C			Visuell wahrnehmbare Zuckungen des Tieres nach Überführung in 100°C	
	Ja	Nein	Nicht auswertbar	Erst kein Anstieg, dann starker Anstieg	Nur geringer oder kein Anstieg	Nicht auswertbar wegen zu vieler Störsignale	Ja	Nein
Hummer Stufe 1	12	4		7	0	1	7	1
Hummer Stufe 2	9	1		7	1	0	3	5
Flusskrebs Stufe 1	6	18	0	3	12	0		
Flusskrebs Stufe 2	0	5	2	5	1	1		

Tabelle 2: Große Hummer und Flusskrebse nach Betäubung mit Crustastun und Überführung in kochendes Wasser: Fläche unter Kurve einer FFT (Fast Fourier Transformation) bis physiologisch definierter Nullpunkt erreicht ist

Hummer: t-Test: keine signifikanten Unterschiede bei Hummern, daher Daten zusammengefasst

Flusskrebse: t-Test: signifikante Unterschiede ($P=0,05$) zwischen den Gruppen

	Überführung in 100°C nach	N=	Mittelwert	SD
Hummer Kontrolle (aus Zwischenbericht)	1 min	8	3504,4	1175,0
Hummer Stufe 1	1 min	4	2661,19	1111,26
	5 min	4	3053,74	928,03
Hummer Stufe 2	1 min	3	1281,06	860,13
	5 min	5	3766,55	568,99
Hummer Stufe 1 zusammengefasst	1 und 5 min	8	2857,57	970,76
Hummer Stufe 2 zusammengefasst	1 und 5 min	8	2834,49	1432,16
Flusskrebse Kontrolle	1 min	5 von 5	2355,6	916,7
Flusskrebse Stufe 1	1 min	12 von 15	518,37	334,25
Flusskrebse Stufe 2	1 min	5 von 7	345,9	307,67
Flusskrebse nach langsamer Erwärmung		1 von 7 (Aussetzer des Verstärkers und hochfrequente anhaltende Störsignale)	42,84	

Tabelle 3: Zeitraum bis Erreichung des definierten physiologischen Nullwerts (Fläche unter Kurve einer FFT) nach Überführung in 100°C Wasser. Kein signifikanter Unterschied bei Hummern; signifikanter Unterschied bei Flusskrebse zwischen Kontrolle und mit Crustastun behandelten Tieren ($p=0,5$).

	N=	Mittelwert [Sekunden]	SD
Hummer Kontrolle (aus Zwischenbericht)	8	154,7	30,3
Hummer Stufe 1	8	145,38	46,73
Hummer Stufe 2	8	153	37,13
Flusskrebse Kontrolle	5	79	16,7
Flusskrebse Stufe 1	12 von 15	45,91	12,1
Flusskrebse Stufe 2	5 von 7	41,2	8,04

Tabelle 4 : Langzeitüberleben bzw. Letalität nach Betäubung mit Crustastun bei Hummer *Homarus americanus*, Flusskrebs *Astacus leptodactylus*, Strandkrabbe *Carcinus maenas*, Taschenkrebs *Cancer pagurus*

	N=	Erholung des Tieres	Tier tot
Hummer Stufe 1	7	5	2
Hummer Stufe 2	3	1	2
Flusskrebse Stufe 1 (mit Ableitung)	8	6	2
Flusskrebse Stufe 1 (ohne Ableitung)	10	9	1
Flusskrebse Stufe 2 (ohne Ableitung)	10	9	1
Strandkrabben Stufe 1	10	9	1
Strandkrabben Stufe 2	10	5	5
Taschenkrebse Stufe 2	6	3	3

Tabelle 5: Relative Reizweiterleitung bei Großen Hummern <i>Homarus americanus</i> nach Behandlung mit Crustastun							
	Reizort	Stufe 1 N=	Mittelwert Stufe 1	SD	Stufe 2 N=	Mittelwert Stufe 2	SD
Kontrolle/ vor Behandlung	Kopf	7	6,61687	3,80022	6	7,15238	2,33984
	Telson	7	10,01996	7,31388	6	14,07911	7,23287
	Schreitbeine	7	6,9651	3,87209	6	7,82724	4,23406
1 min	Kopf	6	0,96834	0,16334	4	0,93354	0,1123
	Telson	6	1,18488	0,72459	4	0,98151	0,24501
	Schreitbeine	6	0,84533	0,48763	4	0,77935	0,18813
5 min	Kopf	5	1,45462	0,8825	5	1,24339	0,37149
	Telson	5	2,14939	1,47097	5	1,84199	0,50129
	Schreitbeine	5	1,42659	0,75499	5	1,20914	0,2859
10 min	Kopf	6	1,46343	0,30773	5	2,15456	0,80282
	Telson	6	3,74171	2,39392	5	4,50325	0,92887
	Schreitbeine	6	1,97161	0,57543	5	2,09342	0,67808
15 min	Kopf	6	1,88888	0,65542	6	2,5734	1,35401
	Telson	6	5,17317	4,93665	6	2,42768	0,906
	Schreitbeine	6	2,25134	1,20326	6	6,13331	1,41403
30 min	Kopf	6	3,0244	2,15855	5	3,82702	1,52699
	Telson	6	13,0525	17,19273	5	14,45613	7,019
	Schreitbeine	6	3,91273	3,47846	5	4,0314	1,68911
60 min	Kopf	6	3,56777	2,92068	6	4,99978	2,57315
	Telson	6	14,04505	13,95111	6	24,26768	22,62707
	Schreitbeine	6	6,95889	5,67835	6	4,91068	2,91615
120 min	Kopf	6	7,17495	6,8431	4	7,41114	4,13192
	Telson	6	20,43875	15,35562	4	36,78235	25,99935
	Schreitbeine	6	7,83015	7,65571	4	8,85981	7,21296
>180 min	Kopf	4	16,90759	11,24219	2	4,48604	1,89529
	Telson	4	29,30172	7,8099	2	31,27318	26,97802
	Schreitbeine	4	14,89597	1,97428	2	8,94198	9,11655

Tabelle 6: Relative Reizweiterleitung bei Flusskrebse nach Behandlung mit Crustastun (Stufe 1)				
	Reizort	N=	Mittelwert	SD
Kontrolle/Vor Betäubung	Kopf	10	2,54701	0,94605
	Telson	10	3,51039	1,79286
	Schreitbeine	10	1,94862	0,84157
1 min	Kopf	10	0,99991	0,17931
	Telson	10	0,96979	0,16831
	Schreitbeine	10	0,88345	0,24294
5 min	Kopf	8	1,30195	0,74384
	Telson	8	1,21345	0,50588
	Schreitbeine	8	0,89403	0,25631
10 min	Kopf	7	1,18077	0,27611
	Telson	7	1,75787	1,46733
	Schreitbeine	7	1,01557	0,1808
15 min	Kopf	6	1,46745	0,70383
	Telson	6	2,48228	2,8771
	Schreitbeine	6	1,20199	0,42054
30 min	Kopf	10	1,84334	1,53668
	Telson	10	2,10669	1,25877
	Schreitbeine	10	1,43311	0,61627
60 min	Kopf	10	3,54455	3,24134
	Telson	10	4,33641	3,93382
	Schreitbeine	10	2,22954	1,35643
120 min	Kopf	5	2,63422	1,69089
	Telson	5	3,72533	2,81147
	Schreitbeine	5	1,98696	1,0481
>180 min	Kopf	10	2,20397	1,25507
	Telson	10	3,33702	1,85711
	Schreitbeine	10	2,69788	2,12931

Tabelle 5 – Daten des Experiments mit langsamer Erwärmung des Hälterungswassers bei Hummern <i>Homarus americanus</i>						
Temperatur	Stimulationsort	N=	Mittelwert relative Aktivität bei mechanischer Stimulation	Standard-abweichung	Mittelwert relative Grundaktivität	Standard-abweichung
7,5°C	Kopf	3	5,95675	2,48738	1	
	Telson	3	9,41016	5,19393		
	Schreitbeine	3	4,45117	1,15307		
10°C	Kopf	3	2,81206	0,47839	1,2385	0,56781
	Telson	3	5,03516	3,34104		
	Schreitbeine	2	3,41786	0,52094		
12,5°C	Kopf	2	4,90564	1,057	1,31995	0,42433
	Telson	2	4,98303	0,53979		
	Schreitbeine	2	3,49521	0,21766		
15°C	Kopf	2	3,33678	1,19561	1,667	0,40447
	Telson	2	5,00278	1,66674		
	Schreitbeine	2	3,07702	1,40982		
17,5°C	Kopf	2	3,41708	0,79024	1,582	0,6067
	Telson	2	5,8766	2,20584		
	Schreitbeine	2	2,66137	0,81508		
20°C	Kopf	3	1,86676	0,47273	2,238	0,7863
	Telson	3	2,43857	1,23813		
	Schreitbeine	2	2,01079	0,39679		
22,5°C	Kopf	2	1,74268	0,60084	3,1075	0,36699
	Telson	2	3,16929	2,16215		
	Schreitbeine	2	1,19027	0,14613		
25°C	Kopf	3	1,57588	0,66012	3,367	0,80327
	Telson	3	2,01688	1,19468		
	Schreitbeine	3	1,17319	0,173		
27,5°C	Kopf	2	1,10786	0,24546	2,6915	2,18425
	Telson	2	1,82017	1,2053		
	Schreitbeine	2	1,12916	0,12196		
30°C	Kopf	3	0,9966	0,06491	1,77655	0,84209
	Telson	3	1,18046	0,27598		

	Schreitbeine	3	0,91887	0,07556		
32,5°C	Kopf	3	1,07375	0,16804	0,921	0,45396
	Telson	3	1,09141	0,15336		
	Schreitbeine	3	0,87904	0,14513		
35°C	Kopf	3	0,95873	0,0367	0,66145	0,75314
	Telson	3	0,96648	0,16531		
	Schreitbeine	3	0,85914	0,38517		
37,5°C	Kopf	3	0,93813	0,12291	0,186	0,22203
	Telson	3	1,018	0,08529		
	Schreitbeine	3	0,95627	0,23274		
40,0°C	n/a	1	n/a	n/a	0,0258	

Tabelle 6 – Daten des Experiments mit langsamer Erwärmung des Hälterungswassers bei Flusskrebse <i>Astacus leptodactylus</i>						
Temperatur	Stimulationsort	N=	Mittelwert relative Aktivität bei mechanischer Stimulation	Standardabweichung	Mittelwert relative Grundaktivität	Standardabweichung
7,5°C	Kopf	7	3,2976	1,15083	1	
	Telson	7	7,57741	4,21973		
	Schreitbeine	7	3,0518	1,05094		
10°C	Kopf	6	2,61873	1,989	1,84107	0,78591
	Telson	6	7,05488	5,21857		
	Schreitbeine	6	3,36806	1,81376		
12,5°C	Kopf	7	2,40542	0,91866	2,17651	0,58957
	Telson	7	4,72813	2,2072		
	Schreitbeine	7	2,22291	1,13568		
15°C	Kopf	7	2,48837	1,89566	2,58886	0,86635
	Telson	7	6,08304	5,79006		
	Schreitbeine	7	3,33734	3,7962		
17,5°C	Kopf	7	1,79956	0,78349	2,79814	1,42503
	Telson	7	5,22648	4,58781		
	Schreitbeine	7	2,25043	1,5184		
20°C	Kopf	7	2,15972	0,71226	2,47006	1,09267
	Telson	7	4,29158	2,70721		
	Schreitbeine	7	2,11195	0,72949		
22,5°C	Kopf	7	2,65134	1,79114	2,476	1,22877
	Telson	7	4,24591	4,08817		
	Schreitbeine	7	1,55966	0,72585		
25°C	Kopf	7	1,7383	0,746	1,99027	1,023
	Telson	7	3,17681	1,29352		
	Schreitbeine	7	1,6762	0,74494		
27,5°C	Kopf	7	1,80843	0,79273	1,64543	0,82947
	Telson	7	3,07544	1,21615		
	Schreitbeine	7	1,80622	0,80781		
30°C	Kopf	7	1,31867	0,14001	1,30317	0,66265
	Telson	7	2,39685	0,91911		
	Schreitbeine	7	1,97958	0,6383		
32,5°C	Kopf	7	0,97326	0,24314	1,23463	0,86714
	Telson	7	1,76355	0,97823		
	Schreitbeine	7	1,02392	0,36579		
35°C	Kopf	7	1,12433	0,2506	0,61526	0,22906
	Telson	7	1,62338	0,52153		
	Schreitbeine	7	1,20865	0,45811		

37,5°C	Kopf	6	1,04783	0,32756	0,59362	0,37312
	Telson	6	1,40833	0,48089		
	Schreitbeine	6	1,3833	0,56676		
40°C	Kopf	6	0,81441	0,28528	0,40968	0,43481
	Telson	6	1,29649	0,71338		
	Schreitbeine	6	0,69249	0,40812		
42,5°C	Kopf	2	0,7898	0,23097	0,043 (N=1)	
	Telson	2	0,864	0,19896		
	Schreitbeine	2	0,64159	0,0605		

II. Diskussion zu den Ergebnissen dieses Projekts und Stellungnahme zu den verwendeten Betäubungs- und Tötungsverfahren in Bezug zur Tierschutz Schlachtverordnung

Einleitung

In Deutschland sind aktuell für den menschlichen Verzehr gedachte Hummer durch die Überführung in kochendes Wasser ohne vorherige Betäubung zu töten. Dadurch unterscheiden sie sich von anderen für den menschlichen Konsum verwendete Tierarten, bei denen auf eine Betäubung eine rasche Tötung zu erfolgen hat. Als Beispiele seien der Schlag auf den Kopf bei Aquakulturfischen und der Bolzenschuss bei höheren Wirbeltieren mit anschließender Entblutung genannt. Eine Ausnahme bildet die Hochseefischerei, bei der bisher keine Vorschriften bezüglich des Tierschutzes gelten und bei der ein Großteil des Fangs auf Eis/im Kühlraum für die Verarbeitung vorbereitet wird.

Ein gutes Betäubungsmittel für zum menschlichen Verzehr gedachte Krebse muss mehrere Qualitäten aufweisen. Einerseits darf es keine gesundheitliche Gefährdung für den Konsumenten oder die Umwelt aufweisen (z.B. bei Fehldosierungen). Außerdem sollte es leicht handhabbar und ungefährlich in der Anwendung sein. Andererseits muss es eine rasche Wirkung auf den zu betäubenden Organismus haben und sollte bei ihm keine große Stressreaktion auslösen (können). Betäubungsmittel wie MS-222 oder Nelkenöl (Eugenol) oder Kokainderivate (z.B. Procaine) hinterlassen Rückstände in den Tieren wodurch sie nicht mehr zum Verzehr geeignet sind. Diese Methoden fallen deshalb aus dem Untersuchungsspektrum.

Bisher wurde der Tötungsvorgang von Hummern durch kochendes Wasser wissenschaftlich nicht eingehender untersucht (Aaser, 1949). Während unserer Literatursuche konnten wir nur Publikationen finden, die sich z.B. mit der Schrumpfung der Körperlänge (Ibbott et al., 2001) oder der Änderung des Geschmacks durch den Kochvorgang (z.B. durch Zugabe von Aromastoffen oder anderen Chemikalien; e.g. Calder et al., 2005; Lee et al., 2001), der Gesundheitsvorsorge für den Konsumenten durch Parasitenabtötung im Hummerfleisch (Budiamoako et al., 1992), oder den Arbeitsschutzbedingungen in der verarbeitenden Industrie (z.B. die Gefahr von Asthma für die Arbeitnehmer; Patel und Cockcroft, 1992) beschäftigen. Es gibt auch eine Reihe von Publikationen mit Überlegungen bezüglich des Tierschutzes der Tiere (Gunter, 1961, 1962; Baker, 1962; Benarde, 1962; Schmidt-Nielsen, 1962), aber bisher wurde unseres Wissens nach keine einzige Studie durchgeführt, welche grundlegende Informationen für diese Diskussion liefern kann.

Stellungnahme hinsichtlich der Eignung der derzeit untersuchten Betäubungsmethoden

Elektrobetäubung

Phänotypisch sind die Tiere (Hummer, Flusskrebs u. a.) durch Stromfluss der Elektrobetäubungsgeräte (LAVES und Crustastun) paralysiert und es dauert oftmals mehrere Stunden, bis sie die Kontrolle über ihre Muskulatur wiedererlangen. Teilweise sind anschließend aber massive Verhaltensänderungen beobachtbar, die auf Schädigungen durch die Elektrobetäubung hinweisen. Laut Auskunft des Herstellers des Geräts Crustastun ist eine ca. 85%ige Letalität bei Hummern gegeben, wenn die Tiere im Abstand von 10 Minuten zweimal behandelt werden.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen, die in dieser Art zum ersten Mal bei Wirbellosen durchgeführt wurden, zeigen Unterschiede in der Aktivität des Nervensystems zwischen den großen Hummern und den viel kleineren Flusskrebsen. Die Hummer zeigen, im Anschluss an die Elektrobetäubung eine epileptische Phase, die 10 Minuten und länger anhalten kann. Dabei fällt die Aktivität, die zu Beginn ein Vielfaches der Grundaktivität des Nervensystems betragen kann, langsam ab und sinkt oftmals auf ein viel niedrigeres Niveau, als es vor der Behandlung gegeben war. Solche „epileptischen Phasen“ sind von allen Elektrobetäubungs-Versuchen wie z.B. bei Fischen (Kestin et al., 1995), Hühnern (Raj, 1988; Gregory und Wotton, 1987) oder Schafen (Gregory und Wotton, 1988) bekannt.

Gabe der Versuchstiere in kochendes Wasser führt je nach Größe der Tier nach wenigen Sekunden (kleine Tiere) bis nach 1-2 min (große Hummer) zur Auslöschung aller Signale. Bis dahin werden aber auch Artefakte der Zellzerstörung mit aufgezeichnet und führen zu Signalen. Die ersten 20s ist eine starke neuronale Aktivität (Gr. Hummer) zu verzeichnen. Diese wird überlagert durch eine etwaige Elektrobetäubung, die jedoch einen „epileptischen“ Anfall auslöst, während dessen die Reizweiterleitung normalerweise überlagert wird. Bei kleinen Tieren (Flusskrebs) ist die Elektrobetäubung wirkungsvoll. Dieses könnte daran liegen, dass die Wirkleistung des elektrischen Stroms in den kleinen Tieren größer ist und bei einer höheren Leistungsfähigkeit der Betäubungsgeräte bei großen Tieren eine ähnliche Wirkung eintreten könnte. Bei großen Tieren (Hummern) muss daher nach aktuellem Kenntnisstand derzeit abgewogen werden zwischen Stress, den die Tiere bei der Anwendung der Elektrobetäubung erfahren (Handling und Transport) und der möglichen Überlagerung der Reizweiterleitung durch eine epileptische Aktivität während der Gabe in kochendes Wasser.

Werden die Hummer in der akuten Phase des epileptischen Anfalls (Aktivität höher als die Grundaktivität) stimuliert, kommt es nur in Ausnahmefällen zu einer Reizweiterleitung (RWL) im Nervensystem; bei den meisten Tieren ist jedoch keine RWL nachweisbar. Die Ausnahmefälle könnten auf einen unterschiedlichen Stromfluss innerhalb der Tiere hinweisen, wodurch nicht das komplette, sondern nur

Teile des Nervensystems betroffen sind und in einigen Bereichen noch eine Weiterleitung von Rezeptorinformationen erfolgen kann. Da der Strom im Crustastun dorsoventral durch das Tier fließt, kann es dazu kommen, dass Teile des Nervensystems nicht ausreichend vom Strom durchflossen werden können, wenn das Tier z.B. ein wenig schräg liegt.

Während des Abflachens der Nervensystemaktivität ist eine relativ schnelle Erholung der RWL gegeben. Dies bedeutet, dass es eine Diskrepanz zwischen dem visuellen Habitus der Tiere („betäubt“) und der Aktivität des Nervensystems („Reizweiterleitung vorhanden“) gibt.

Bei den behandelten Flusskrebse ist nach Behandlung im Normalfall keine epileptische Phase und auch keine Reizweiterleitung nachweisbar, und bei Überführung in das kochende Wasser sind nur verzögert leichte Aktivitätserhöhungen zu registrieren, welche wesentlich schwächer sind als bei den Kontrolltieren. Einige Ausnahmen hiervon dürften darauf zurückzuführen sein, dass das Gerät Crustastun für wesentlich größere Tiere ausgelegt ist, so dass der Stromfluss durch unterschiedliche Körperregionen laufen dürfte.

Analog zu den Verhältnissen bei Wirbeltieren kann davon ausgegangen werden, dass die Krebse während der epileptischen Phase keine zentralnervöse Verarbeitung von Umwelt- und somatischen Reizen leisten können.

Betäubung durch Einleitung von CO₂ in das Hälterungswasser

CO₂ Betäubung ist erfolgreich, dauert aber relativ lange (bis 1h) (Hummer: diese Arbeit; Taschenkrebse: Roth und Øines (2010)). Durch einleiten von CO₂ in Wasser sinkt der pH-Wert von ca. pH7 auf pH4,85 - 5,5 ab. Schädigungen durch diesen erniedrigten pH-Wert sollten sich erst frühestens nach mehreren Stunden auswirken (e.g. Munshi und Singh, 1992; McDonald, 1983). Die Betäubung mit CO₂ erfolgt bei Fischen relativ schnell innerhalb weniger Minuten (Fish, 1943). Die von uns gemessenen sehr langen Induktionszeiten haben uns daher überrascht. Bei einer Ausweitung der Anwendung sollte daher über eine Pufferung des pH-Werts nachgedacht werden, da die pH-Wert-Absenkung möglicherweise zu Schädigungen an Kiemen führen kann und zusätzlichen Stress für die Tiere bedeuten dürfte. Die Anwendung von CO₂ für die Einschläferung ist im Labor für die Anwendung bei Ratten und Mäusen weit verbreitet. Es scheint aber so zu sein, dass diese Art der Betäubung bei den genannten Wirbeltieren zu einem stark aversiven Verhalten während der Betäubungsphase führt (Leach et al., 2002), was auf eine nicht tiergerechte Tötung hinweist. Ähnlich ist aktuell die CO₂-Betäubung bei Krebsen einzuschätzen.

Betäubung durch Gabe von $MgCl_2$ in das Hälterungswasser

$MgCl_2$ Betäubung funktioniert bei decapoden Krebsen nicht, obwohl sie bei anderen marinen Tieren seit langem erfolgreich verwendet wird (e.g. Referenzen in Pantin 1962, Smaldon und Lee 1979; Mooney et al. 2010, Bickmeyer 2012, Mordhorst, et al., 2015).

Herabkühlen auf 0°C (Süßwassereis)

Herabkühlen auf 0°C verlangsamt alle Prozesse, beeinträchtigt die Reizweiterleitung ohne sie komplett zu unterbinden (Tang et al., 2010; Soofi et al., 2014; . diese Arbeit). Der Erfolg einer Ruhigstellung durch Kälte hängt stark von der Akklimatisierung der Tiere (Lagerspetz, 1974) und damit ihrer Herkunft und den Hälterungsbedingungen in den Wochen vor der Betäubung ab (Lewis und Ayers, 2014). Kühlen auf Süßwassereis ist aus unserer Sicht für den Kochvorgang nicht geeignet, da dieser dadurch nur verlängert wird (zusätzliche Wiedererwärmungsphase), das Tier nicht komplett anästhesiert ist und eine Reizweiterleitung oft vorhanden sein kann. Dies gilt insbesondere für kaltakklimatisierte Tiere. Bei wärmeakklimatisierten Tieren könnte diese Methode für die Betäubung bzw. Ruhigstellung geeignet sein, wenn die Tiere schnell auf 0°C herabgekühlt werden.

Herabkühlen auf -1,8°C (Seewassereis)

Herabkühlen auf -1,8°C (gefrorenes Seewasser) reduziert die Weiterleitung von externen Reizen in das Zentralnervensystem der Krebse und führt bei längerer Dauer zum Tod der Versuchstiere (diese Arbeit).

Töten durch langsames erwärmen

Langsames erwärmen der Tiere (1°C/min) führt zum Tod der Krebse ohne jegliche Fluchtreaktionen. Bei etwa 25° - 30°C fällt die registrierte Nervenaktivität unter das Kontrollniveau ab und die Tiere sterben. Möglicherweise ist dies die Methode der Wahl um Tiere schonend zu töten. Bei relativ niedriger Temperatur wird die nervöse Aktivität bereits unterbunden und vorher ist sowohl im Nervensystem als auch phänotypisch keine Aufgeregtheit/Erregung festzustellen. (Diese Arbeit; Roth und Ønes, 2010; Baker, 1955; Aaser, 1948).

Betäubung durch Applikation von KCl

Auf eine Behandlung mit Kaliumionen haben wir im ursprünglichen Antrag verzichtet. Es gibt zwar Publikationen, welche die Injektion von Kalium in die Blutbahn von Hummern (Battison et al., 2000) sowie terrestrischer Arthropoden (Bennie et al., 2012) als schnelle und tiergerechte Betäubungs- bzw. Tötungsmethode empfehlen. Allerdings scheinen die Autoren der zwei genannten Publikationen keine genauere Kenntnis von der Funktion der Bindegewebshülle (Perineurium) um das

Nervensystem zu haben. Diese aus Zellen bestehende Struktur schützt die Nervenzellen analog zur Blut-Hirn-Schranke beim Menschen vor schädlichen Einflüssen (Abbott et al., 1986). Sie kontrolliert u.a. den Zugang polarer und nichtpolarer Substanzen zum Nervensystem sowie kontrolliert die Ionenzusammensetzung innerhalb des Nervensystems gegenüber dem extrazellulären Medium (e.g. Pichon et al., 1972, Schofield et al, 1984). Allerdings ist nicht bekannt, wie das Perineurium auf abnormal hohe Konzentrationen an Ionen in der Hämolymphe reagiert. Ohne diese Bindegewebshülle würde die Injektion von Kalium zu einem sofortigen Zusammenbruch des Transmembranpotentials der Nervenzellen und damit einem Ende der Bildung von Aktionspotentialen und so letztlich zu einem Stopp von der Weiterleitung gegebenenfalls von Schmerzinformationen führen. Aufgrund der Bindegewebshülle muss dieses allerdings nicht der Fall sein. Vielmehr kann angenommen werden, dass primär zunächst die Muskulatur betroffen sein dürfte, was die Autoren der beiden erstgenannten Publikationen auch in Form eines Endes des Herzschlags als Erfolgsparameter nennen. Das ZNS hingegen dürfte erst mit einer Verzögerung in Mitleidenschaft gezogen werden.

Stellungnahme zur Tierschutz-Schlachtverordnung, wonach Krebstiere in stark kochendem Wasser getötet werden können, das sie vollständig bedecken und nach ihrer Zugabe weiterhin stark kochen muss

Langsames Erwärmen der Tiere (1°C/min) führt zum Tod der Krebse ohne Fluchtreaktionen. Bei etwa 25° -30° fällt die registrierte Nervenaktivität unter das Kontrollniveau ab und die Tiere sterben.

Gabe der Versuchstiere in kochendes Wasser führt je nach Größe der Tier nach wenigen Sekunden (kleine Tiere) bis nach 1-2 min (große Hummer) zur Auslöschung aller elektrophysiologischen Signale. Bis dahin werden aber auch Artefakte der Zellzerstörung mit aufgezeichnet und führen zu Signalen. Die ersten 20s ist eine starke neuronale Aktivität (Gr. Hummer) zu verzeichnen. Diese wird überlagert durch eine etwaige Elektrobetäubung, die jedoch einen „epileptischen“ Anfall auslöst, während dessen die Reizweiterleitung normalerweise überlagert wird.

Bei kleinen Tieren (Flusskrebse) erscheint die Elektrobetäubung wirkungsvoll. Die Tiere werden allerdings aus Süßwasser in salzhaltiges Wasser überführt um die Leitfähigkeit zu erhöhen. Dies bedeutet sicherlich Stress für die Tiere.

Bei großen Tieren (Hummern) muss abgewogen werden zwischen dem Stress, den die Tiere bei der Anwendung der Elektrobetäubung erfahren (Handhabung und Transport) und dem normalen Kochvorgang. Die Zeit des Stromflusses bis zur Aussetzung der normalen neuronalen Aktivität beträgt bei Wirbeltiere vermutlich mehr als 0,2s -2 Sekunden (Cook et al., 1995; Gregory und Wotton, 1989). Zur Elektrobehandlung im LAVES-Gerät werden die Tiere aus Meerwasser in salzreduziertes Wasser überführt, da die Leitfähigkeit sonst so hoch wäre, dass der Strom zu einem erheblichen Anteil durchs Wasser fließt und die Tiere nicht ausreichend erreicht. Dieses Problem ergibt sich nicht bei der Verwendung von Crustastun, da in diesem Falle der gesamte Strom durch das Tier fließt. Aber auch hier wird das Tier für eine kurze Zeitspanne in eine verdünnte Salzwasserlösung eingetaucht (vom Beginn des Schließens des Deckels bis zum Beginn des Stromflusses). Die Veränderung der Salinität des Umgebungsmediums stellt einen Stressfaktor dar, der bei der Verwendung einer Elektrobetäubungsmethode mit direktem Kontakt der Elektroden mit dem Tier weniger schwer wiegt.

Bei Überführung der Hummer in kochendes Wasser ist sowohl bei Handhabung der mit Crustastun behandelten Tiere als auch direkt im Anschluss nach Gabe in das Wasser keine sofortige Aktivitätserhöhung feststellbar, wie es bei den Kontrolltieren der Fall ist. Die vom epileptischen Anfall herrührende Aktivität fällt noch ca. 10-20 Sekunden lang weiter ab und es kommt erst dann zu einer Erhöhung des elektrophysiologischen Signals. Diese Signale werden wahrscheinlich vom Kochvorgang selbst herbeigeführt.

Wir beobachteten weder bei behandelten noch unbehandelten Tieren eine Fluchtreaktion nach Überführung in kochendes Wasser, und auch Autotomie (McVean, 1975) konnten wir nicht feststellen. Dies unterscheidet sich von Angaben in der Literatur (z.B. Roth und Øines, 2010; Baker, 1955).

Die Elektrobetäubung erscheint als sinnvoll die Tiere zu paralysieren. Ob dies eine Verkürzung des etwaigen Leidens hervorruft bleibt fraglich. Analog der Situation in Wirbeltieren könnte davon ausgegangen werden, dass bei den Tieren während eines epileptiformen Anfalls keine neuronale Verarbeitung mehr möglich ist und sie in dieser Phase getötet werden können, ohne dass tierrechtlich Bedenken entstehen. Bei Krebsen dauert die Paralyse sowohl der Muskulatur als auch des Nervensystems nach Elektrobehandlung länger als bei Wirbeltieren, welche für die Schlachtung elektrisch betäubt werden. Die Ergebnisse mit den Flusskrebse weisen darauf hin, dass es einen Mindeststromfluss zu geben scheint, ab dem die Tiere so stark geschädigt werden, dass das Nervensystem keine epileptische Phase mehr ausbilden kann. Dementsprechend sollten Elektrobetäubungsgeräte so optimiert sein, dass die Tiere sich nach einmaliger Behandlung nicht mehr erholen können und der Stromfluss eindeutig letal ist. Starke Stromflüsse können allerdings zu einer lokalen Erwärmung der Tiere an den Kontaktstellen mit den Elektroden führen.

Die Elektrobehandlung wirkt sich bei Hummern auf etwa die ersten 20s im heißen Wasser aus, aber fängt mit der Überführung in salzreduziertes Wasser und das Betäubungsgerät wesentlich früher an. Die äußerlich paralysierten Tiere zeigen eine starke neuronale Aktivität, welche die Reizweiterleitung im ZNS überlagert. Da bei Decapoden Krebsen Nociceptoren und Fasern nicht eindeutig nachgewiesen sind und Schmerz als Phänomen höherer neuronaler Zentren angesehen wird ist doch eine wichtige neuronale Schutzfunktion bei diesen Tieren bei Verletzungen zu erwarten.

So gut wie alle Tiere zeigen Vermeidungsreaktionen bei drohenden Verletzungen, ob man diese nun Schmerz nennt oder nicht.

Krebse verfügen über Nervenzellen, die bei Temperaturerhöhung ihre Aktivität erniedrigen (Kerkut und Taylor, 1958), sowie über Nervenzellen, die bei Temperaturniedrigung ihre Aktivität erhöhen (Tani und Kuramoto, 1998). In einem Temperaturgradienten orientieren sie sich nach einem präferiertem Temperaturbereich, welcher von der vorherigen Akklimatisation abhängig ist (e.g. Verbitskii und Verbitskaya, 2012). Sie sind also in der Lage, Temperaturveränderungen zu registrieren und darauf zu reagieren. Bei marinen decapoden Krebsen, die in Gewässern mit ausgeglichenen Temperaturen leben, stellen starke Hitzereize möglicherweise im natürlichen Lebensraum keine bedrohliche Situation dar, weil diese normalerweise nicht vorkommen. Sie werden möglicherweise deshalb nicht registriert oder zumindest durch ein bestimmtes Verhalten beantwortet. Arten, die in variableren Habitaten leben (Flusskrebse, Strandkrabben), sind an schnelle Temperaturveränderungen in ihrer Umgebung eher

angepasst, diese sind allerdings verbunden mit anderen starken Änderungen in der Umgebung wie z.B. Sauerstoffgehalt, Lichtintensität, Salinität (z.B. Styriehave et al., 2003). Ausgehend von fehlendem Fluchtverhalten (Schwanzfächerschlag etc.) bei schneller Erwärmung und auch bei sehr langsamer Erwärmung und in Ermangelung sicherer und wirksamer Betäubungsverfahren, bleibt die Gabe in heißes Wasser ohne Vorbehandlung notgedrungen eine Alternative zur Behandlung und Tötung von dekapoden Krebsen. Auch wenn bei den Autoren ein unangenehmes Gefühl bleibt, können wir andere Betäubungs-/Tötungsverfahren derzeit nicht uneingeschränkt empfehlen. Dies lässt die gegenwärtige Datenlage der Literatur und der eigenen hier präsentierten Messungen nicht zu.

Literaturdatenbank zum Thema Literatur nach Themen geordnet (Einzelne Publikationen können deshalb mehrfach vertreten sein)

Arbeiten zur Schmerzperzeption generell und bei Krebsen

- Appel, M. & Elwood, R. W. 2009. Gender differences, responsiveness and memory of a potentially painful event in hermit crabs. *Animal Behaviour* **78**: 1373-1379.
- Appel, M. & Elwood, R. W. 2009. Motivational trade-offs and potential pain experience in hermit crabs. *Applied Animal Behaviour Science* **119**: 120-124.
- Babcock, D. T., Shi, S., Jo, J., Shaw, M., Gutstein, H. B. & Galko, M. J. 2011. Hedgehog signaling regulates nociceptive sensitization. *Curr Biol* **21**: 1525-1533.
- Baker, J. R. 1955. Experiments on the humane killing of crabs. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **34**: 15-24.
- Baker, J. R. 1962. Humane killing of crustaceans. *Science* **135**: 587.
- Barr, S., Laming, P. R., Dick, J. T. A. & Elwood, R. W. 2008. Nociception or pain in a decapod crustacean? *Animal Behaviour* **75**: 745-751.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **139**: 267-284.
- Bateson, P. 1991. Assessment of pain in animals. *Animal Behaviour* **42**: 827-839.
- Baumgärtner, U. 2010. Nozizeptives System. Nozizeptoren, Fastertypen, spinale Bahnen und Projektionsareale. *Schmerz* **24**: 105-113.
- Belfer, I. 2013. Nature and nurture of human pain. *Scientifica (Cairo)* **2013**: 415279.
- Benarde, M. 1962. Humane killing of crustaceans. *Science* **135**: 587.
- Braun, D. A. (2010) Philosophische Verwicklungen der neurobiologischen Bewusstseinsforschung. In: *Philosophische Fakultät*. pp. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br.
- Braz, J. M., Nassar, M. A., Wood, J. N. & Basbaum, A. I. 2005. Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron* **47**: 787-793.
- Broom, D. M. 2007. Cognitive ability and sentience: Which aquatic animals should be protected? *Diseases of Aquatic Organisms* **75**: 99-108.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. & Julius, D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816-824.
- Cavanaugh, D. J., Lee, H., Lo, L., Shields, S. D., Zylka, M. J., Basbaum, A. I. & Anderson, D. J. 2009. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9075-9080.
- Chervova, L. S. 1997. Pain sensitivity and behaviour of fishes. *Journal of Ichthyology* **37**: 98-102.
- Chudler, E. H. & Dong, W. K. 1983. The assessment of pain by cerebral evoked potentials. *Pain* **16**: 221-244.
- Clark, R. E. & Squire, R. 1998. Classical conditioning and brain systems: the role of awareness. *Science* **280**: 77-81.
- Committee, I. A. C. a. U. (2011) Animal Care and Use Procedure Fish and Amphibian Euthanasia. pp. Cornell University.
- Cooper, J. E. 2011. Anesthesia, analgesia, and euthanasia of invertebrates. *ILAR Journal* **52**: 196-204.
- Cooper, L. N. 2007. On the problem of consciousness. *Neural Networks* **20**: 1057.
- Crook, J. H. 1983. On attributing consciousness to animals. *Nature* **303**: 11-14.
- Crook, R. J., Dickson, K., Hanlon, R. T. & Walters, E. T. 2014. Nociceptive sensitization reduces predation risk. *Current Biology* **24**: 1121-1125.
- Crook, R. J. & Walters, E. T. 2011. Nociceptive behaviour and physiology of molluscs: animal welfare implications. *ILAR Journal* **52**: 185-195.
- Denburg, J. L., Eldefrawi, M. E. & O'Brien, R. D. 1972. Macromolecules from lobster axon membranes that bind cholinergic ligands and local anesthetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**: 177-181.
- Dong, X., Han, S.-k., Zylka, M. J., Simon, M. I. & Anderson, D. J. 2001. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* **106**: 619-632.
- Dubin, A. E. & Patapoutian, A. 2010. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation* **120**: 3760-3772.
- Elwood, R. W. 2011. Pain and suffering in invertebrates? *ILAR Journal* **52**: 175-184.
- Elwood, R. W. 2012. Evidence for pain in decapod crustaceans. *Animal Welfare* **21**: 23-27.
- Elwood, R. W. & Appel, M. 2009. Pain experience in hermit crabs? *Animal Behaviour* **77**: 1243-1246.
- Elwood, R. W., Barr, S. & Patterson, L. 2009. Pain and stress in crustaceans? *Applied Animal Behaviour Science* **118**:

- 128-136.
- Engel, A. K. (2005) Neuronale Synchronisation und Wahrnehmungsbewusstsein. In: *Bewusstsein - Philosophie, Neurowissenschaften, Ethik*, (Hermann, C. S., Pauen, M., Rieger, J. W. & Schicktzanz, S., eds.) pp. 216-241. Wilhelm Fink Verlag, München.
- Engel, A. K. (2006) Neuronale Grundlagen der Merkmalsintegration. In: *Neuropsychologie*, (Kamath, H. O. & Thier, P., eds.) pp. Springer, Heidelberg.
- Engel, A. K. & Singer, W. (2001) Neuronale Grundlagen des Bewusstseins. In: *Computer Gehirn: Was kann der Mensch?* pp. 62-85. Heinz Nixdorf MuseumsForum, Paderborn.
- Fiorito, G. 1986. Is there "pain" in invertebrates? *Behavioural Processes* **12**: 383-388.
- Fischer, M. J. M., Mak, S. W. Y. & McNaughton, P. A. 2010. Sensitisation of nociceptors - what are ion channels doing? *The Open Pain Journal* **3**: 82-96.
- Fowler, M. A. & Montell, C. 2013. *Drosophila* TRP channels and animal behavior. *Life Science* **92**: 394-403.
- Freeman, W. J. 2007. Indirect biological measures of consciousness from field studies of brains as dynamical systems. *Neural Networks* **20**: 1021-1031.
- Geffeney, S. L., Cueva, J. G., Glauser, D. A., Doll, J. C., Lee, T. H., Montoya, M., Karania, S., Garakani, A. M., Pruitt, B. L. & Goodman, M. B. 2011. DEG/ENaC but not TRP channels are the major mechano-electrical transduction channels in a *C. elegans* nociceptor. *Neuron* **71**: 845-857.
- Gherardi, F. 2009. Behavioural indicators of pain in crustacean decapods. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* **45**: 432-438.
- Giotta, G. J., Gargiulo, R. J. & Wang, H. H. 1973. Binding of spin-labeled local anesthetics to lobster nerves. *Journal of Membrane Biology* **13**: 233-244.
- Giurfa, M. 2013. Cognition with few neurons: higher-order learning in insects. *Trends in Neurosciences* **36**: 285-294.
- Gregory, N. S., Harris, A. L., Robinson, C. R., Dougherty, P. M., Fuchs, P. N. & Sluka, K. A. 2013. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *The Journal of Pain* **14**: 1255-1269.
- Griffin, D. R. & Speck, G. B. 2004. New evidence of animal consciousness. *Animal Cognition* **7**: 5-18.
- Gunter, G. 1961. Painless killing of crabs and other large crustaceans. *Science* **133**: 327.
- Gunter, G. 1962. Humane killing of crustaceans. *Science* **135**: 588-593.
- Hall, D. H. & Treinin, M. 2011. How does morphology relate to function in sensory arbors? *Trends in Neurosciences* **34**: 443-451.
- Hoyle, C. H. 2011. Evolution of neuronal signalling: transmitters and receptors. *Auton Neurosci* **165**: 28-53.
- Hucho, T. & Levine, J. D. 2007. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron* **55**: 365-376.
- Im, S. H. & Galko, M. J. 2012. Pokes, sunburn, and hot sauce: *Drosophila* as an emerging model for the biology of nociception. *Developmental Dynamics* **241**: 16-26.
- Jamieson, D. 1998. Science, knowledge, and animal minds. *Proceedings of the Aristotelian Society New Series* **98**: 79-102.
- Jennings, R. C. 1998. A philosophical consideration of awareness. *Applied Animal Behaviour Science* **57**: 201-211.
- Johnson, W. A. & Carder, J. W. 2012. *Drosophila* nociceptors mediate larval aversion to dry surface environments utilizing both the painless TRP channel and the DEG/ENaC subunit, PPK1. *PLoS One* **7**: e32878.
- Julius, D. & Basbaum, A. I. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**: 203-210.
- Kavaliere, M. 1988. Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Research Bulletin* **21**: 923-931.
- Kawano, T., Zoga, V., McCallum, J. B., Wu, H. E., Gemes, G., Liang, M. Y., Abram, S., Kwok, W. M., Hogan, Q. H. & Sarantopoulos, C. D. 2009. ATP-sensitive potassium currents in rat primary afferent neurons: biophysical, pharmacological properties, and alterations by painful nerve injury. *Neuroscience* **162**: 431-443.
- Krasne, F. B., Kemenes, G. & Glanzman, D. L. (1998) Analysis of learning in invertebrates. pp. 47-64. Elsevier.
- Lau, B. K. & Vaughan, C. W. 2014. Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. *Current Opinion in Neurobiology* **29**: 159-164.
- Leach, M. C., Bowell, V. A., Allan, T. F. & Morton, D. B. 2004. Measurement of aversion to determine humane methods of anaesthesia and euthanasia. *Animal Welfare* **13**.
- Lehman, H. 1998. Animal awareness. *Applied Animal Behaviour Science* **57**: 315-325.
- Leung, M. K. & Stefano, G. B. 1987. Comparative neurobiology of opioids in invertebrates with special attention to senescent alterations. *Progress in Neurobiology* **28**: 131-159.
- Lewin, G. R. 2013. Natural selection and pain meet at a sodium channel. *Science*.
- Li, J. X. & Zhang, Y. 2012. Emerging drug targets for pain treatment. *European Journal of pharmacology* **681**: 1-5.
- Macpherson, L. J., Xiao, B., Kwan, K. Y., Petrus, M. J., Dubin, A. E., Hwang, S., Cravatt, B., Corey, D. P. & Patapoutian, A. 2007. An ion channel essential for sensing chemical damage. *The Journal of Neuroscience* **27**: 11412-11415.
- Malafoglia, V., Bryant, B., Raffaelli, W., Giordano, A. & Bellipanni, G. 2013. The zebrafish as a model for nociception studies. *Journal of Cellular Physiology* **228**: 1956-1966.

- Manev, H. & Dimitrijevic, N. 2004. Drosophila model for in vivo pharmacological analgesia research. *European Journal of Pharmacology* **491**: 207-208.
- Marder, E. 2011. Variability, compensation, and modulation in neurons and circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108 Suppl 3**: 15542-15548.
- Mather, J. A. 2011. Philosophical background of attitudes toward and treatment of invertebrates. *ILAR Journal* **52**: 205-212.
- Matthews, M. & Varga, Z. M. 2012. Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR Journal* **53**: 192-204.
- Min, J. W., Liu, W. H., He, X. H. & Peng, B. W. 2013. Different types of toxins targeting TRPV1 in pain. *Toxicol* **71**: 66-75.
- Moffat, R. & Rae, C. P. 2011. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* **12**: 12-15.
- Mogil, J. S. 2009. Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience* **10**: 283-394.
- Mogil, J. S., Davis, K. D. & Derbyshire, S. W. 2010. The necessity of animal models in pain research. *Pain* **151**: 12-17.
- Neely, G. G., Hess, A., Costigan, M., Keene, A. C., Goulas, S., Langeslag, M., Griffin, R. S., Belfer, I., Dai, F., Smith, S. B., Diatchenko, L., Gupta, V., Xia, C. P., Amann, S., Kreitz, S., Heindl-Erdmann, C., Wolz, S., Ly, C. V., Arora, S., Sarangi, R., Dan, D., Novatchkova, M., Rosenzweig, M., Gibson, D. G., Truong, D., Schramek, D., Zoranovic, T., Cronin, S. J., Angjeli, B., Brune, K., Dietzl, G., Maixner, W., Meixner, A., Thomas, W., Pospisilik, J. A., Alenius, M., Kress, M., Subramaniam, S., Garrity, P. A., Bellen, H. J., Woolf, C. J. & Penninger, J. M. 2010. A genome-wide *Drosophila* screen for heat nociception identifies alpha2delta3 as an evolutionarily conserved pain gene. *Cell* **143**: 628-638.
- Nockemann, D., Rouault, M., Labuz, D., Hublitz, P., McKnelly, K., Reis, F. C., Stein, C. & Heppenstall, P. A. 2013. The K⁺ channel GIRK2 is both necessary and sufficient for peripheral opioid-mediated analgesia. *EMBO Mol Med* **5**: 1263-1277.
- Nunez, J., Aleida, L., Balderrama, N. & Giurfa, M. 1998. Alarm pheromones induce stress analgesia via an opioid system in the honeybee. *Physiology and Behavior* **63**: 75-80.
- Orton, S. T. 1926. Neuropathology - II. *Archives of Neurology and Psychiatry* **16**: 451-470.
- Peterson, A., Norton, L., Naci, L., Owen, A. M. & Weijer, C. 2014. Toward a science of brain death. *The American Journal of Bioethics* **14**: 29-31.
- Peterson, N. C. & Servinsky, M. D. 2007. Development of molecular and cellular biomarkers. *Comparative Medicine* **57**: 556-562.
- Peterson, N. C. & Servinsky, M. D. 2007. Development of molecular and cellular biomarkers of pain. *Comparative Medicine* **57**: 554-562.
- Piggins, D. & Phillips, C. J. C. 1998. Awareness in domesticated animals - concepts and definitions. *Applied Animal Behaviour Science* **57**: 181-200.
- Price, T. J. & Dussor, G. 2014. Evolution: the advantage of 'maladaptive' pain plasticity. *Current Biology* **24**: R384-386.
- Pritchett, L. C., Ulibarri, C., Roberts, M. C., Schneider, R. K. & Sellon, D. C. 2003. Identification of potential physiological and behavioral indicators of postoperative pain in horse after exploratory celiotomy for colic. *Applied Animal Behaviour Science* **80**.
- Puri, S. & Faulkes, Z. 2010. Do decapod crustaceans have nociceptors for extreme pH? *PLoS One* **5**: e10244.
- Puri, S. & Faulkes, Z. (????) Nociception in decapod crustaceans - Conference poster. pp.
- Reynders, A., Mantilleri, A., Malapert, P., Rialle, S., Nidelet, S., Laffray, S., Beurrier, C., Bourinet, E. & Moqrich, A. 2015. Transcriptional profiling of cutaneous MRGPRD free nerve endings and C-LTMRs. *Cell Reports* **10**: 1007-1019.
- Rose, J. D., Arlinghaus, R., Cooke, S. J., Diggles, B. K., Sawynok, W., Stevens, E. D. & Wynne, C. D. L. 2014. Can fish really feel pain? *Fish and Fisheries* **15**: 97-133.
- Rose, M. A. 1996. The problem of pain: concepts and issues. *ANZCCART News* **9**: 2-4.
- Rowe, A. H., Xiao, Y., Rowe, M. P., Cummins, T. R. & Zakon, H. H. 2013. Voltage-gated sodium channel in grasshopper mice defend against bark scorpion toxin. *Science* **342**: 441-446.
- Salzen, E. A. 1998. Emotion and self-awareness. *Applied Animal Behaviour Science* **57**.
- Schmidt-Nielsen, K. 1962. Humane killing of crustaceans. *Science* **135**: 587-588.
- Short, C. E. 1998. Fundamentals of pain perception in animals. *Applied Animal Behaviour Science* **59**: 125-133.
- Sjölander, S. 1997. On the evolution of reality - some biological prerequisites and evolutionary stages. *Journal of Theoretical Biology* **187**: 595-600.
- Smith, E. S. & Lewin, G. R. 2009. Nociceptors: a phylogenetic view. *Journal of Comparative Physiology A* **195**: 1089-1106.
- Sneddon, L. U. 2004. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Research Reviews* **46**: 123-130.
- Sneddon, L. U., Braithwaite, V. A. & Gentle, M. J. 2003. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a

- vertebrate sensory system. *Proceedings of the Royal Society. B.* **270**: 1115-1121.
- Sneddon, L. U., Elwood, R. W., Adamo, S. A. & Leach, M. C. 2014. Defining and assessing animal pain. *Animal Behaviour* **97**: 201-212.
- Snider, W. D. & McMahon, S. B. 1998. Tackling pain at the source - new ideas about nociceptors. *Neuron* **20**: 629-632.
- Spiecker-Hauser, U. (2004) Prüfung von Flupiritin im Vergleich mit analgetisch und sedativ wirksamen Stoffe in einem Thermischen Schmerzmodell bei Katzen. In: *Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie*. pp. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- St John Smith, E., Purfurst, B., Grigoryan, T., Park, T. J., Bennett, N. C. & Lewin, G. R. 2012. Specific paucity of unmyelinated C-fibers in cutaneous peripheral nerves of the African naked-mole rat: comparative analysis using six species of *Bathyergidae*. *Journal of Comparative Neurology* **520**: 2785-2803.
- Stefano, G. B., Cadet, P., Zhu, W., Rialas, C. M., Mantione, K., Benz, D., Fuentes, R., Casares, F., Fricchione, G. L., Fulop, Z. & Slingsby, B. 2002. The blueprint for stress can be found in invertebrates. *Endocrinology Letters* **23**: 85-93.
- Tobin, D. M. & Bargmann, C. I. 2004. Invertebrate nociception: behaviors, neurons and molecules. *Journal of Neurobiology* **61**: 161-174.
- Tracey, W. D., R.I., W., Laurent, G. & Benzer, S. 2003. *painless*, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell and Tissue Research* **113**: 261-273.
- van Rijn, C. M., Krijnen, H., Menting-Hermeling, S. & Coenen, A. M. 2011. Decapitation in rats: latency to unconsciousness and the 'wave of death'. *PLoS One* **6**: e16514.
- von Hehn, C. A., Baron, R. & Woolf, C. J. 2012. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron* **73**: 638-652.
- Wilson-Sanders, S. E. 2011. Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. *ILAR Journal* **52**: 126-152.
- Yao, M., Rosenfeld, J., Attridge, S., Sidhu, S., Aksenov, V. & Rollo, C. D. 2009. The Ancient Chemistry of Avoiding Risks of Predation and Disease. *Evolutionary Biology* **36**: 267-281.
- Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S. & Ryba, N. J. 2009. Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* **139**: 234-244.
- Yu, Y. Q., Zhao, Z. Y., Chen, X. F., Xie, F., Yang, Y. & Chen, J. 2013. Activation of tetrodotoxin-resistant sodium channel NaV1.9 in rat primary sensory neurons contributes to melittin-induced pain behavior. *Neuromolecular Medicine* **15**: 209-217.
- Yuan, S. & Burrell, B. D. 2012. Long-term depression of nociceptive synapses by non-nociceptive afferent activity: role of endocannabinoids, Ca²⁺, and calcineurin. *Brain Research* **1460**: 1-11.
- Zandt, B. J., ten Haken, B., van Dijk, J. G. & van Putten, M. J. 2011. Neural dynamics during anoxia and the "wave of death". *PLoS One* **6**: e22127.
- Zaslansky, R., Sprecher, E., Tenke, C. E., Hemli, J. A. & Yarnitsky, D. 1996. The P300 in pain evoked potentials. *Pain* **66**: 39-49.
- Zhang, D. 2012. Patch clamp: a powerful technique for studying the mechanism of acupuncture. *Evid Based Complement Alternat Med* **2012**: 534219.

Literatur zu Betäubungs- und Tötungsverfahren, Gesetze u.ä.

- Ackerman, P. A., Morgan, J. D. & Iwama, G. K. (ohne Angabe) Fish anesthetics. pp. Canadian Council on Animal Care, Ottawa.
- Andrews, P. L. R. 2011. Introduction: Laboratory Invertebrates: Only spineless, or spinless and painless? *ILAR Journal* **52**: 121-125.
- Andrews, P. L. R., Darmaillacq, A.-S., Dennison, N., Gleadall, I. G., Hawkins, P., Messenger, J. B., Osorio, D., Smith, V. J. & Smith, J. A. 2013. The identification and management of pain, suffering and distress in cephalopods, including anaesthesia, analgesia and humane killing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **447**: 46-64.
- Advocats for Animals (2005) Cephalopods and decapod crustaceans - their capacity to experience pain and suffering pp., Edinburgh, Scotland.
- Anonymus 1984. Forschungsvorhaben - tierschutzgerechtes Töten von Aalen Abschlussbericht. *Der Fischwirt* **34**: 11-13.
- Ashley, P. J. 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* **104**: 199-235.
- American Veterinary Medical Association. (2013). *AVMA Guidelines for the euthanasia of animals 2013*. Schaumburg, USA.
- Baici, F. (2004) Faire Fische - Betäubungsverfahren im Vergleich 2004. pp. Verein Fair-Fish, Winterthur.
- Bekoff, M. 2007. Aquatic animals, cognitive ethology, and ethics: questions about sentience and other troubling issues that lurk in turbid waters. *Diseases of Aquatic Organisms* **75**.
- Borski, R. J. & Hodson, R. G. 2003. Fish research and the institutional animal care and use committee. *ILAR Journal* **44**: 286-294.
- Brännäs, E., Kiessling, A., Algers, B. & Eriksson, L.-O. 2007. *Unterlag för praxis vid hantering av odlad fisk i samband med slakt*. Institutionen för Vilt, Fisk och Miljö.
- Bundestag, D. (2003) Drucksache 15/723 Tierschutzbericht 2003. pp. Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft.
- Buser, P. 2010. Conscience de l'homme, conscience de l'animal. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France* **163**: 333-338.
- Carere, C., Wood, J. B. & Mather, J. 2011. Species differences in captivity: where are the invertebrates? *Trends in Ecology & Evolution* **26**: 211.
- Coyle, S. D., Durbin, R. M. & Tidwell, J. H. (2004) Anesthetics in aquaculture. In: *Southern Regional Aquaculture Center*, Vol. 3900. pp.
- Craig, A. D. 2009. A rat is not a monkey is not a human: comment on Mogil (Nature Rev. Neurosci. 10, 283-294 (2009)). *Nature Reviews Neuroscience* **10**: 466.
- Crook, J. H. 1983. On attributing consciousness to animals. *Nature* **303**: 11-14.
- Crook, R. J. 2013. The welfare of invertebrate animals in research: Can science's next generation improve their lot? *PostDoc Journal* **1**: 9-20.
- Crook, R. J. & Walters, E. T. 2011. Nociceptive behavior and physiology of molluscs: animal welfare implications. *ILAR Journal* **52**: 185-195.
- De Tolla, L. J., Srinivas, S., Whitaker, B. R., Andrews, C., Hecker, B., Kane, A. S. & Reimschuessel, R. 1995. Guidelines for the care and use of fish in research. *ILAR Journal* **37**: 159-173.
- Diggles, B. K., Cooke, S. J., Rose, J. D. & Sawynok, W. 2011. Ecology and welfare of aquatic animals in wild capture fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **21**: 739-765.
- EFSA 2004. Opinion of the scientific panel on animal health and welfare on a request from the commission related to welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals. *The EFSA Journal* **45**: 1-29.
- EFSA 2005. Opinion on the "Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes". *The EFSA Journal* **292**: 1-46.
- EFSA 2005. Opinion on the "Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes" (and Corrigenda). *The EFSA Journal* **292**: 1-46.
- EFSA 2009. Food safety considerations concerning the species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed fish. *The EFSA Journal* **1190**: 1-16.
- EFSA 2009. Knowledge gaps and research needs for the welfare of farmed fish. *The EFSA Journal* **1145**: 1-9.
- EFSA 2009. Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed tuna. *The EFSA Journal* **1072**: 1-53.
- EFSA 2009. Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed Atlantic salmon. *The EFSA Journal* **2012**: 1-77.
- EFSA 2009. Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed carp. *The EFSA*

- Journal* **1013**: 1-37.
- EFSA 2009. Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed eel (*Anguilla anguilla*). *The EFSA Journal* **1014**: 1-42.
- EFSA 2009. Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed eels (*Anguilla anguilla*). *The EFSA Journal* **1014**: 1-41.
- EFSA 2009. Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed fish: rainbow trout. *The EFSA Journal* **1013**: 1-55.
- EFSA 2009. Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed turbot. *The EFSA Journal* **1073**: 1-34.
- EFSA 2014. Scientific opinion on electrical requirements for poultry waterbath stunning equipment. *The EFSA Journal* **12**: 3745.
- Eisemann, C. H., Jorgensen, W. K., Merritt, D. J., Rice, M. J., Cribb, B. W., Webb, P. D. & Zalucki, M. P. 1984. Do insects feel pain? A biological view. *Experientia* **40**: 164-167.
- Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V. (2009) Empfehlung für die Haltung, den Transport und das tierschutzgerechte Töten von Versuchsfischen.
- Farstad, W., Bøe, K. E., Braastad, B. O., Fossum, K., Hjeltnes, B., Juell, J.-E. & Waagbø, R. (2005) Opinion of the Scientific Panel on the Animal Health and Welfare of the Norwegian Scientific Committee for the Food Safety related to the ability of various groups of invertebrates to sense and perceive discomfort, pain and stress when these organisms are exposed to human handling. pp. Norwegian Scientific Committee for Food Safety.
- Fisch, R. E., Brown, M. J., Danneman, P. J. & Karas, A. Z. 2008. *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*, 2 ed. Academic Press, Amsterdam.
- Flecknell, P. 2009. *Laboratory animal anaesthesia*. Academic Press.
- Forschungsgemeinschaft, D. (ohne Angabe) Tierversuche in der Forschung. pp.
- Gracely, R. H. 1999. Pain measurement. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **43**: 897-908.
- Gregory, N. G. 2004. *Physiology and behaviour of animal suffering*. Blackwell.
- Gregory, N. S. (1996) Farm animal research benefiting animals. In: *Farm Animals in Biomedical and Agricultural Research*, (Baker, R. M., Einstein, R. & Mellor, D. J., eds.). pp. 24-34. Wellington.
- Grens, K. 2014. To kill a lab rat. *The Scientist Magazine Online*: 41378.
- Harvey-Clark, C. 2011. IACUC Challenges in invertebrate research. *ILAR Journal* **52**: 213-220.
- Håstein, T., Scarfe, A. D. & Lund, V. L. 2005. Science-based assessment of welfare: aquatic animals. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris)* **24**: 529-547.
- Håstein, T., Scarfe, A. D. & Lund, V. L. 2005. Science-based assessment of welfare: aquatic animals. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris)* **24**: 529-547.
- Heitler, W. J. & Edwards, D. H. 1998. Effect of temperature on a voltage-sensitive electrical synapse in crayfish. *The Journal of Experimental Biology* **201**.
- Helms, J. E. & Barone, C. P. 2008. Physiology and treatment of pain. *Critical Care Nurse* **28**: 38-50.
- Horvath, K., Angeletti, D., Nascetti, G. & Carere, C. 2013. Invertebrate welfare: an overlooked issue. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* **49**: 9-17.
- Hulings, N. C. & Gray, J. S. 1971. *A manual for the study of meiofauna*. Smithsonian Institution Press, Washington.
- ILAR 2011. Spineless wonders - welfare and use of invertebrates in the laboratory and classroom. *ILAR Journal* **52**.
- Jessup, D. A. 2009. Review of: Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. *Journal of Wildlife Diseases* **45**: 552-554.
- Johnston, C. & Jungalwalla, P. (2005) Aquatic animal welfare guidelines. (Australia, N. A. C., ed.). pp. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry.
- Jones, R. C. 2012. Science, sentience, and animal welfare. *Biology & Philosophy* **28**: 1-30.
- Justiz, B. d. 2010. Tierschutzgesetz (TierSchG).
- Justiz, B. d. 2012. Verordnung zum Schutz von Tieren im Zusammenhang mit der Schlachtung oder Tötung und zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1099/2009 des Rates (Tierschutz-Schlachtverordnung - TierSchlV).
- Kellert, S. R. 1993. Values and perceptions of invertebrates. *Conservation Biology* **7**: 845-855.
- Kenny, K. & Quimby, F. W. 1990. Biological specimens other than intact living vertebrate animals available for biomedical research. *ILAR News* **32**: A4-A15.
- Kolar, R. 2006. Animal experimentation. *Science and Engineering Ethics* **12**: 111-122.
- L.G., R. & B, R. 2008. *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*, 3 ed. Blackwell, Oxford.
- le Bars, D., Gozariu, M. & Cadden, S. W. 2001. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews* **53**: 597-652.
- Leopoldina, D. A. d. N. (2012) Ad-hoc Stellungnahme Tierversuche in der Forschung. Empfehlungen zur Umsetzung der EU-Richtlinie 2010/63/EU in deutsches Recht. pp.
- Leshner, A. & Pfaff, D. W. 2011. Quantification of behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108 Suppl 3**: 15537-15541.

- Lewbart, G. A. 2011. *Invertebrate Medicine*, 2 ed. Wiley-Blackwell.
- Lewbart, G. A. & Mosley, C. 2012. Clinical anesthesia and analgesia in invertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine* **21**: 59-70.
- Lockwood, J. A. 1987. The moral standing of insects and the ethics of extinction. *The Florida Entomologist* **70**: 70-89.
- Lockwood, J. A. 1988. Not to harm a fly: our ethical obligations to insects. *Between the Species* **4**: 204-211.
- Lowe, T. E. & Gregory, N. G. (1999) A humane end for lobsters. In: *New Zealand Science Monthly Online*. pp.
- Manteca, X. 1998. Neurophysiology and assessment of welfare. *Meat Science* **49**: S205-S218.
- Mather, J. A. & Anderson, R. C. 2007. Ethics and invertebrates : a cephalopod perspective. *Diseases of Aquatic Organisms* **75**.
- Mejdell, C. (2003) Forsvarlig avliving av tiftokreps. pp. 13. VESO för Statens dyrehelsetilsyn.
- Menzel, M., Brembs, B. & Giurfa, M. (2007) Cognition in invertebrates. In: *Evolution of Nervous Systems*, Vol. 1 (Kaas, J. H., ed.). pp. Elsevier, Amsterdam.
- Mery, F. 2013. Natural variation in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology* **23**: 52-56.
- Miller, J. P. & Jacobs, G. A. 1984. Relationships between neuronal structure and function. *Journal of Experimental Biology* **112**: 129-145.
- Ministerium für Ernährung, L., Forsten und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (2000) Durchführungsvorschrift zur Umsetzung des § 13 Abs. 6 der Tierschutz-Schlachtverordnung: Elektrobetäubung/ -tötung im Wasserbad von gewerbsmäßig gefangenen Aalen im Zusammenhang mit der Schlachtung.
- Mogil, J. S. 2009. Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience* **10**: 283-394.
- Mulcahy, D. M. 2009. L. G. Ross and B. Ross: Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals (Third Edition). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **20**: 139-140.
- Murphy, M. C. & Kruse, G. H. 1995. An annotated bibliography of capture and handling effects on crabs and lobsters. *Alaska Fishery Research Bulletin* **2**: 23-75.
- Murrell, J. C. & Johnson, C. B. 2006. Neurophysiological techniques to assess pain in animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **29**: 325-335.
- Neiffer, D. L. & Stamper, M. A. 2009. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: Considerations, methods, and types of drugs. *ILAR Journal* **50**: 343-360.
- Proctor, H., Carder, G. & Cornish, A. 2013. Searching for animal sentience: a systematic review of the scientific literature. *Animals* **3**: 882-906.
- Reilly, J. S. 2001. *Euthanasia of animals used for scientific purposes*, 2 ed. Adelaide University - Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching, Adelaide.
- Reilly, J. S. (2001) Euthanasia of animals used for scientific purposes.
- Ross, L. G. & Ross, B. 2008. *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*, 3 ed. Blackwell, Oxford.
- RSPCA - Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals. (2009) Humane electrical stun/killing of Crustacea.
- Sajeevan, S. (2015) Anaesthesia and anaesthetics for the controlled management of fresh water fishes. pp. Internet Aquafind Database.
- Salomon, B., Appel, M., Schöffl, H., Tritthart, H. A. & Juan, H. (2001) Endbericht zur Studie - Erfassung und Bewertung des Leidens sowie der Belastung transgener Tiere im Tierversuch im Vergleich zu konventionellen Tierversuchen. pp. Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur Österreich, Wien.
- Salomon, B., Appl, H., Schöffl, H., Tritthart, H. A. & Juan, H. (2001) Erfassung und Bewertung des Leidens sowie der Belastung transgener Tiere im Tierversuch im Vergleich zu konventionellen Tierversuchen. Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur, Wien.
- Sawyer, D. C. 1998. Pain control in small-animal patients. *Applied Animal Behaviour Science* **59**: 135-146.
- Schütt-Abraham, I. (2002) Tierschutzgerechte Betäubung von Schlachttieren. Schriftliche Vortragszusammenfassung. pp.
- science, C. C. o. A. C. i. 2010. *CCAS guidelines for euthanasia of animals used in science*. Canadian Council on Animal Care, Ottawa.
- Sherwin, C. M. 2001. Can invertebrates suffer? Or, how robust is argument-by-analogy? *Animal Welfare* **10**: S103-118.
- Sjölander, S. 1997. On the evolution of reality - some biological prerequisites and evolutionary stages. *Journal of Theoretical Biology* **187**: 595-600.
- Smith, J. A. 1991. A question of pain in invertebrates. *ILAR Journal* **33**: 25-31.
- Smith, J. A., Andrews, P. L. R., Hawkins, P., Louhimies, S., Ponte, G. & Dickel, L. 2013. Cephalopod research and EU Directive 2010/63/EU: Requirements, impacts and ethical review. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **447**: 31-45.
- Smith, S. A. 2011. Invertebrate resources on the internet. *ILAR Journal* **52**: 165-174.
- Sømme, L. S. (2005) Report to Norwegian Scientific Committee for Food safety - Sentience and pain in

- invertebrates. pp. Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- Stasiak, K. L., Maul, D., French, E., Hellyer, P. W. & Vandewoude, S. 2003. Species-specific assessment of pain in laboratory animals. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* **42**: 13-20.
- State of Victoria, D. o. P. I. (2007) A resource kit for membership on an animal ethics committee in Victoria Canada. pp. Department of Primary Industries.
- Stevens, C. W. 1992. Alternatives to the use of mammals for pain research. *Life Sciences* **50**: 901-912.
- U.S. Congress, O. o. T. A. 1986. *Alternatives to animal use in reasearch, testing, and education*. Washington.
- van de Vis, H., Kestin, S., Robb, D., Oehlenschläger, J., Lambooj, B., Münkner, W., Kuhlmann, H., Kloosterboer, K., Tejada, M., Huidobro, A., Ottera, H., Roth, B., Sørensen, N. K., Akse, L., Byrne, H. & Nesvadba, P. 2003. Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquaculture Research* **34**: 211-220.
- Weary, D. M., Niel, L., Flower, F. C. & Fraser, D. 2006. Identifying and preventing pain in animals. *Applied Animal Behaviour Science* **100**: 64-76.
- Whiteside, G. T., Pomonis, J. D. & Kennedy, J. D. 2013. An industry perspective on the role and utility of animal models of pain in drug discovery. *Neuroscience Letters* **557**: 65-72.
- Yeates, J. W., Röcklinsberg, H. & Gjerris, M. 2011. Is welfare all that matters? A discussion of what should be included in policy-making regarding animals. *Animal Welfare* **20**: 423-432.
- Yue, S. (2009) An HSUS Report: The welfare of farmed fish at slaughter. pp. The Humane Society of the United States.

Literatur zum Thema “elektrische Betäubung”

- Bager, F., Braggins, T. J., Devine, C. E., Graafhuis, A. E., Mellor, D. J., Taverner, A. & Upsdell, M. P. 1992. Onset of insensibility at slaughter in calves: effects of electroplectic seizure and exsanguination on spontaneous electrocortical activity and indices of cerebral metabolism. *Research in Veterinary Science* **52**: 162-173.
- Beaumont, W. R. C., Taylor, A. A. L., Lee, M. J. & Welton, J. S. 2002. *Guidelines for electric fishing best practice*. Environment Agency.
- Beyssen, C., Babile, R. & Fernandez, X. 2004. Electrocardiogram spectral analysis and somatosensory evoked potentials as tools to assess electrical stunning efficiency in ducks. *British Poultry Science* **45**: 409-415.
- Catania, K. 2014. The shocking predatory strike of the electric eel. *Science* **346**: 1231-1234.
- Contreras, C. C. & Beraquet, N. J. 2001. Electrical stunning, hot boning, and quality of chicken breast meat. *Poultry Science* **80**: 501-507.
- Cook, C. J., Devine, C. E., Gilbert, K. V., Smith, D. D. & Maasland, S. A. 1995. The effect of electrical head-only stun duration on electroencephalographic-measured seizure and brain amino acid neurotransmitter release. *Meat Science* **40**: 137-147.
- Cook, C. J., Devine, C. E., Taverner, A. & Gilbert, K. V. 1992. Contribution of amino acid transmitters to epileptiform activity and reflex suppression in electrically head stunned sheep. *Research in Veterinary Science* **52**: 48-56.
- Croft, P. G. 1953. Electric stunning and electrocution of small animals. *The Veterinary Record* **65**: 259-261.
- Gabriel, C., Gabriel, S. & Corthout, E. 1996. The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey. *Physics in Medicine and Biology* **41**: 2231-2249.
- Gregory, N. G. 2005. Recent concerns about stunning and slaughter. *Meat Science* **70**: 481-491.
- Gregory, N. G. & Wotton, S. B. 1987. Effect of electrical stunning on the electroencephalogram in chickens. *British Veterinary Journal* **143**.
- Gregory, N. G. & Wotton, S. B. 1988. Sheep slaughtering procedures V. Responsiveness to potentially painful stimuli following electrical stunning. *British Veterinary Journal* **144**.
- Gregory, N. G. & Wotton, S. B. 1989. Effect of electrical stunning on somatosensory evoked potentials in chickens. *British Veterinary Journal* **145**: 159-164.
- Gregory, N. G. & Wotton, S. B. 1990. Effect of stunning on spontaneous physical activity and evoked activity in the brain. *British Poultry Science* **31**: 215-220.
- Grimsbø, E., Nortvedt, R., Hammer, E. & Roth, B. 2014. Preventing injuries and recovery for electrically stunned Atlantic salmon (*Salmo salar*) using high frequency spectrum combined with a thermal shock. *Aquaculture* **434**: 277-281.
- Halsband, E. 1956. Die Beziehung zwischen Intensität und Zeitdauer des Reizes bei der elektrischen Durchströmung von Fischen. *Archiv für Fischereiwissenschaft* **7**: 74-81.
- Hartley, W. G. 1977. The use of electricity for anaesthetizing fish. *Journal of Fish Biology* **11**: 377-378.
- Hopkins, C. D. 1988. Neuroethology of electric communication. *Annual Reviews of Neuroscience* **11**: 497-535.
- Kestin, S., Wotton, S. & Adams, S. (1995) The effect of CO₂, concussion or electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on fish welfare. In: *Aqua Nor '95*, Vol. 23. pp. EAS Special Publication, Trondheim, Norway.
- Kettlewell, P. J. & Hallworth, R. N. 1990. Electrical stunning of chickens. *Journal of Agricultural Engineering Research*

- 47**: 139-151.
- King, R. A. & Glasser, R. L. 1970. Duration of electroconvulsive shock-induced retrograde amnesia in rats. *Physiology and Behavior* **5**: 335-339.
- Lamarque, P. (1990) Electrophysiology of fish in electric fields. In: *Fishing with electricity - applications in freshwater fisheries managements*, (Cowx, I. G. & Lamarque, P., eds.) pp. Wiley.
- Lambooj, E., Gerritzen, M. A., Reimert, H., Burggraaf, D. & van de Vis, J. W. 2008. A humane protocol for electro-stunning and killing of Nile tilapia in fresh water. *Aquaculture* **275**: 88-95.
- Lambooj, E., Grimsbø, E., van de Vis, J. W., Nortvedt, R. & Roth, B. 2010. Percussion and electrical stunning of Atlantic salmon (*Salmo salar*) after dewatering and subsequent effect on brain and heart activity. *Aquaculture* **300**: 107-112.
- Lambooj, E., Kloosterboer, R. J., Gerritzen, M. A. & van de Vis, J. W. 2004. Head-only electrical stunning and bleeding of African catfish (*Clarias gariepinus*): assessment of loss of consciousness. *Animal Welfare* **13**: 71-76.
- Lambooj, E., Pilarczyk, M., Bialowas, H., van den Boogaart, J. G. M. & van de Vis, J. W. 2007. Electrical and percussive stunning of the common carp (*Cyprinus carpio* L.): neurological and behavioural assessment. *Aquacultural Engineering* **37**: 171-179.
- Lambooj, E., Van de Vis, J. W., Münkner, W., Oehlenschläger, J., Kloosterboer, R. J. & Pieterse, C. 2002. A feasible method for humane slaughter of eel (*Anguilla anguilla* L.): electrical stunning in fresh water prior gutting. *Aquaculture Research* **33**: 643-652.
- Lines, J. & Kestin, S. 2004. Electrical stunning of fish: the relationship between the electric field strength and water conductivity. *Aquaculture* **241**: 219-234.
- Lines, J. & Kestin, S. 2005. Electric stunning of trout: power reduction using a two-stage stun. *Aquacultural Engineering* **32**: 483-491.
- Lines, J. A., Robb, D. H., Kestin, S. C., Crook, S. C. & Benson, T. 2003. Electric stunning: a humane slaughter method for trout. *Aquacultural Engineering* **28**: 141-154.
- Loftsgard, G., Braathen, S. & Helgebostad, A. 1972. Electrical stunning of mink. *The Veterinary Record* **91**: 132-134.
- Ludvigsen, S., Stenklev, N. C., Johnsen, H. K., Laukli, E., Matre, D. & Aas-Hansen, O. 2014. Evoked potentials in the Atlantic cod following putatively innocuous and putatively noxious electrical stimulation: a minimally invasive approach. *Fish Physiology and Biochemistry* **40**: 173-81.
- Madden, J. A. & Houston, A. H. 1976. Use of electroanaesthesia with freshwater teleosts: some physiological consequences in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* **9**: 457-462.
- Metzner, W. 1999. Neural circuitry for communication and jamming avoidance in gymnotiform electric fish. *The Journal of Experimental Biology* **202**: 1365-1375.
- Montgomery, J., Carton, G., Voigt, R., Baker, C. & Diebel, C. 2000. Sensory processing of water currents by fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **355**: 1325-1327.
- Neil, D. (2010) The effect of the Crustastun™ on nerve activity in crabs and lobsters. pp. University of Glasgow, Glasgow.
- Orsi, J. A. & Short, J. W. 1987. Modifications in electrical anesthesia for salmonids. *The Progressive Fish-Culturist* **49**: 144-146.
- Orton, S. T. 1926. Neuropathology. *Archives of Neurology and Psychiatry* **15**: 763-775.
- Pethig, R. 1984. Dielectric properties of biological materials: biophysical and medical applications. *IEEE Transactions on Electrical Insulation* **19**: 453-474.
- Prinz, S., Van Oijen, G., Ehinger, F., Bessei, W. & Coenen, A. 2010. Effects of waterbath stunning on the electroencephalograms and physical reflexes of broilers using a pulsed direct current. *Poultry Science* **89**: 1275-1284.
- Raj, A. B. M. 2003. A critical appraisal of electrical stunning in chickens. *World's Poultry Science Journal* **59**: 89-99.
- Raj, M. 1988. Welfare during stunning and slaughter of poultry. *Poultry Science* **77**: 1815-1819.
- Raj, M. & Tserveni-Gousi, A. 2000. Stunning methods for poultry. *World's Poultry Science Journal* **56**: 291-304.
- Reimers, U. (2008) Untersuchung zur Elektrotäubung von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). In: *Zentrum für Infektionsmedizin, Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung und Institut für Zoologie*. pp. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- Robb, D. H. F., O' Callaghan, M., Lines, J. A. & Kestin, S. C. 2002. Electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): factors that affect stun duration. *Aquaculture* **205**: 359-371.
- Robb, D. H. F. & Roth, B. 2003. Brain activity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following electrical stunning using various field strength and pulse durations. *Aquaculture* **216**: 363-369.
- Robb, D. H. F., Wotton, S. B. & van de Vis, J. W. 2002. Preslaughter electrical stunning of eels. *Aquaculture Research* **33**: 37-42.
- Roques, J. A. C., Abbink, W., Chereau, G., Fourneyron, A., Spanings, T., Burggraaf, D., van de Bos, R., van de Vis, H. & Flik, G. 2012. Physiological and behavioral responses to an electrical stimulus in Mozambique tilapia

- (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiology and Biochemistry* **38**: 1019-1028.
- Rümmler, F., Schreckenbach, K., Göthling, U. & Schiewe, S. 2004. Untersuchungen zu den Auswirkungen des Elektrofischfangs auf Fische. *Schriften des Instituts für Binnenfischerei e.V. Potsdam-Sacrow* **14**: 1-97.
- Shields, S. J. & Raj, A. B. M. 2010. A critical review of electrical water-bath stun systems for poultry slaughter and recent developments in alternative technologies. *Journal of Applied Animal Welfare Science* **13**: 281-299.
- Snyder, D. E. (2003) Electrofishing and its harmful effects on fish. In: *USGS Information and Technology Report*. pp. U.S. Geological Survey
- Sparrey, J. (2005) Testing of Crustastun single crab and lobster stunner. pp. LiveTec, Bedford.
- Stenevik, I. H., Kjæstad, H. P., Håstein, T. & Mejdell, C. M. (2008) Bedøving og avliving av tiftokreps - elektrisk apparatur og saltløsning. In: *Veterinærinstituttet rapportserie*, Vol. 16. pp. Veterinærinstituttet, Oslo.
- Trushenski, J. T. & Bowker, J. D. 2012. Effect of voltage and exposure time on fish response to electrosedation. *Journal of Fish and Wildlife Management* **3**: 276-287.
- Urca, G., Nof, A., Weissman, B.-A. & Sarne, Y. 1983. Analgesia induced by electroconvulsive shock: brain enkephalins may mediate tolerance but not the induction of analgesia. *Brain Research* **260**: 271-277.
- Urca, G., Yitzhaky, J. & Frenk, H. 1981. Efferent opioid systems may participate in post-electroconvulsive shock (ECS) analgesia and catalepsy. *Brain Research* **219**: 385-396.
- Zivotofsky, A. Z. & Strous, R. D. 2012. A perspective on the electrical stunning of animals: are there lessons to be learned from human electro-convulsive therapy (ECT)? *Meat Science* **90**: 956-961.

Betäubung mit Kohlendioxid

- Altun, T., Bilgin, R. & Danasbas, D. 2009. Effects of sodium bicarbonate on anesthesia of common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) juveniles. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **9**: 29-31.
- Bell, G. R. 1987. *An outline of anesthetics and anesthesia for salmonids, a guide for fish culturists in British Columbia*.
- Bernier, N. J. & Randall, D. J. 1998. Carbon dioxide anaesthesia in rainbow trout: effects of hypercapnic level and distress on induction and recovery from anaesthetic treatment. *Journal of Fish Biology* **52**: 621-637.
- Bierbower, S. M. & Cooper, R. L. 2010. The effects of acute carbon dioxide on behavior and physiology in *Procambarus clarkii*. *Journal of Experimental Zoology A* **313**: 484-497.
- Bierbower, S. M. & Cooper, R. L. 2013. The mechanistic action of carbon dioxide on a neural circuit and NMJ communication. *Journal of Experimental Zoology A* **319**: 340-354.
- Booke, H. E., Hollender, B. & Lutterbie, G. 1978. Sodium bicarbonate, an inexpensive fish anesthetic for field use. *The Progressive Fish-Culturist* **40**: 11-13.
- Burkholder, T. H., Niel, L., Weed, J. L., Brinster, L. R., Bacher, J. D. & Foltz, C. J. 2010. Comparison of carbon dioxide and argon euthanasia: effects on behavior, heart rate, and respiratory lesions in rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* **49**: 448-453.
- Conlee, K. M., Stephens, M. L., Rowan, A. N. & King, L. A. 2005. Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats. *Laboratory Animals* **39**: 137-161.
- Erikson, U. 2011. Assessment of different stunning methods and recovery of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*): isoeugenol, nitrogen and three levels of carbon dioxide. *Animal Welfare* **20**: 365-375.
- Fish, F. F. 1943. The anaesthesia of fish by high carbon dioxide concentrations. *Transactions of the American Fisheries Society* **72**: 25-29.
- Gheshmy, A., Vukelich, R., Noronha, A. & Reid, S. G. 2006. Chronic hypercapnia modulates respiratory-related central pH/CO₂ chemoreception in an amphibian, *Bufo marinus*. *The Journal of Experimental Biology* **209**: 1135-1146.
- Gilderhus, P. A. & Marking, L. L. 1987. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management* **7**: 288-292.
- Ishimatsu, A., Kikkawa, T., Hayashi, M. & Lee, K.-S. 2004. Effects of CO₂ on marine fish: larvae and adults. *Journal of Oceanography* **60**: 731-741.
- Kestin, S., Wotton, S. & Adams, S. (1995) The effect of CO₂, concussion or electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on fish welfare. In: *Aqua Nor '95*, Vol. 23. pp. EAS Special Publication, Trondheim, Norway.
- Korhonen, H. T., Cizinauskas, S. & Jesernics, J. 2012. Electrophysiological study on CO and CO₂ euthanasia in mink (*Mustela vison*). *Annals of Animal Science* **12**.
- Leach, M. C., Bowell, V. A., Allan, T. F. & Morton, D. B. 2004. Measurement of aversion to determine humane methods of anaesthesia and euthanasia. *Animal Welfare* **13**.
- Loch, J. J. (1991) Carbon dioxide as an anesthetic for handling steelhead collected at the Toutle River collection facility, 1990. pp. 39. Wahsington Department of Wildlife Fisheries Management Division, Olympia, Washington.
- Makowska, I. J., Vickers, L., Mancell, J. & Weary, D. M. 2009. Evaluating methods of gas euthanasia for laboratory

- mice. *Applied Animal Behaviour Science* **121**: 230-235.
- McDonald, D. G. 1983. The effects of H⁺ upon the gills of freshwater fish. *Canadian Journal of Zoology* **61**: 691-703.
- McKeegan, D. E. F., McIntyre, J., Demmers, T. G. M., Wathes, C. M. & Jones, R. B. 2006. Behavioural responses of broiler chickens during acute exposure to gaseous stimulation. *Applied Animal Behaviour Science* **99**: 271-286.
- Muijsers, H., van Triel, J. J., Duistermaat, E. & Bos, P. M. 2014. Acute toxicity of high concentrations of carbon dioxide in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **69**: 201-6.
- Munshi, J. S. D. & Singh, A. 1992. Scanning electron microscopic evaluation of effects of low pH on gills of *Channa punctata* (Bloch). *Journal of Fish Biology* **41**: 83-89.
- Niel, L. & Weary, D. M. 2007. Rats avoid exposure to carbon dioxide and argon. *Applied Animal Behaviour Science* **107**: 100-109.
- Otsuguro, K.-i., Yasutake, S., Yamaji, Y., Ban, M., Ohta, T. & Ito, S. 2007. Why does carbon dioxide produce analgesia? *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* **14**: 101-106.
- Peake, S. 1998. Sodium bicarbonate and clove oil as potential anesthetics for nonsalmonid fishes. *North American Journal of Fisheries Management* **18**: 919-924.
- Post, G. 1979. Carbonic acid anesthesia for aquatic organisms. *The Progressive Fish-Culturist* **41**: 142-144.
- Prince, A. M. J., Low, S. E. & Lissimore, T. J. 1995. Sodium bicarbonate and acetic acid: an effective anesthetic for field use. *North American Journal of Fisheries Management* **15**: 170-172.
- Raj, A. B. M., Johnson, S. P. & McInstry, J. L. 1997. Welfare implications of gas stunning pigs: 3. the time to loss of somatosensory evoked potentials and spontaneous electrocortigram of pigs during exposure to gases. *The Veterinary Journal* **153**: 329-340.
- Robb, D. H. F., Wotton, S. B., McKinstry, J. L., Sørensen, N. K. & Kestin, S. C. 2000. Commercial slaughter method used on Atlantic salmon: determination of the onset of brain failure by electroencephalography. *The Veterinary Record* **147**: 298-303.
- Smaldon, G. 1978. In praise of soda water. *Biology Curators Group Newsletter* **2**: 18-19.
- Truchot, J. P. (1983) Regulation of acid-base balance. In: *Internal anatomy and physiological regulation*, (Bliss, D. E., ed.). pp. 27 The biology of crustacea. Academic Press.
- van Mechelen, J. A. N. (1985) Report on a practical training at the salmonid enhancement project. Department of Fisheries and Oceans, Canada. II. The use of carbon dioxide as an anesthetic for fish. pp. Quinsam Hatchery, Department of Fisheries and Oceans. Box 467, Campbell River, B.C. V9W 5C1.
- Vandergoot, C. S., Murchie, K. J., Cooke, S. J., Dettmers, J. M., Bergstedt, R. A. & Fielder, D. G. 2011. Evaluation of two forms of electroanesthesia and carbon dioxide for short-term anesthesia in walleye. *North American Journal of Fisheries Management* **31**: 914-922.
- Weinzierl, W. (1996) Vergleichende Untersuchungen zur manuellen Tötung, Elektrobetäubung und CO₂-Betäubung bei Karpfen, Aal und Forelle im Hinblick auf Fischfleischqualität und Tierschutz. In: *Tierärztliche Fakultät*. pp. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Wong, D., Makowska, I. J. & Weary, D. M. 2013. Rat aversion to isoflurane versus carbon dioxide. *Biology Letters* **9**: 20121000.
- Yoshikawa, H., Ishida, Y., Ueno, S. & Mitsuda, H. 1988. The use of sedating action of CO₂ for long-term anesthesia in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi* **54**: 545-551.

Betäubung mit Chemikalien wie MS-222, Magnesium, Kalium, andere Substanzen u.a.

- Ackerman, P. A., Morgan, J. D. & Iwama, G. K. (ohne Angabe) Anesthetics. pp. Canadian Council on Animal Care.
- Ahmad, M. F. 1969. Anaesthetic effects of tricaine methane sulphonate (MS 222 Sandoz) on *Gammarus pulex* (L.) (Amphipoda). *Crustaceana* **16**: 197-201.
- Andrews, P. L. R. & Tansey, E. M. 1981. The effects of some anaesthetic agents in *Octopus vulgaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* **70**: 241-247.
- Aran Mooney, T., Lee, W.-J. & Hanlon, R. T. 2010. Long-duration anesthetization of squid (*Doryteuthis pealeii*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **43**: 297-303.
- Battison, A., MacMillan, R., MacKenzie, A., Rose, P., Cawthorn, R. & Horney, B. 2000. Use of injectable potassium chloride for euthanasia of American lobster (*Homarus americanus*). *Comparative Medicine* **50**: 545-550.
- Bell, G. R. 1987. *An outline of anesthetics and anesthesia for salmonids, a guide for fish culturists in British Columbia*.
- Bennie, N. A., Loaring, C. D., Bennie, M. M. & Trim, S. A. 2012. An effective method for terrestrial arthropod euthanasia. *The Journal of Experimental Biology* **215**: 4237-4241.
- Benson, E. R., Alphin, R. L., Rankin, M. K., Caputo, M. P., Kinney, C. A. & Johnson, A. L. 2012. Evaluation of EEG based determination of unconsciousness vs. loss of posture in broilers. *Res Vet Sci* **93**: 960-4.
- Blaustein, M. P. & Goldman, D. E. 1966. Comparative action of calcium and procaine on lobster axon. *The Journal*

- of *General Physiology* **49**: 1043-1063.
- Bosworth, B. G., Small, B. C., Gregory, D., Kim, J., Black, S. & Jerrett, A. 2007. Effects of rested-harvest using the anesthetic AQUI-S™ on channel catfish, *Ictalurus punctatus*, physiology and fillet quality. *Aquaculture* **262**: 302-318.
- Brown, P. B., White, M. R., Chaille, J., Russell, M. & Oseto, C. 1996. Evaluation of three anesthetic agents for crayfish (*Orconectes virilis*). *Journal of Shellfish Research* **15**: 433-435.
- Butt, D., O'Connor, S. J., Kuchel, R., O'Connor, W. A. & Raftos, D. A. 2008. Effects of the muscle relaxant, magnesium chloride, on the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* **275**: 342-346.
- Cho, G. K. & Heath, D. D. 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research* **31**: 537-546.
- Cooke, S. J., Suski, C. D., Ostrand, K. G., Tufts, B. L. & Wahl, D. H. 2004. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture* **239**: 509-529.
- Coyle, S. D., Dasgupta, S., Tidwell, J. H., Beavers, T., Bright, L. A. & Yasharian, D. K. 2005. Comparative efficacy of anesthetics for the freshwater prawn *Macrobrachium roenbergii*. *Journal of the World Aquaculture Society* **36**: 282-290.
- Denburg, J. L., Eldefrawi, M. E. & O'Brien, R. D. 1972. Macromolecules from lobster axon membranes that bind cholinergic ligands and local anesthetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**: 177-181.
- Ehrhardt, J. P., Wissocq, J. W. & Niaussat, P. 1970. Le clomethiazole, un nouvel anesthésique pour les animaux marins. *XXX Comptes Rendus Biologie* **10**: 1984-1988.
- Erikson, U., Lambooi, B., Digre, H., Reimert, H. G. M., Bondø, M. & der Vis, H. v. 2012. Conditions for instant electrical stunning of farmed Atlantic cod after de-watering, maintenance of unconsciousness, effects of stress, and fillet quality — A comparison with AQUI-S™. *Aquaculture* **324-325**: 135-144.
- Fritz, L. C., Wang, C. C. & Gorio, A. 1979. Avermectin B_{1a} irreversibly blocks postsynaptic potentials at the lobster neuromuscular junction by reducing muscle membrane resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 2062-2066.
- Gamble, J. C. 1969. An anaesthetic for *Corophium volutator* (Pallas) and *Marinogammarus obtusatus* (Dahl), Crustacea, Amphipoda. *Experientia* **25**: 539-540.
- Gannon, J. E. & Gannon, S. A. 1975. Observations on the narcotization of crustacean zooplankton. *Crustaceana* **28**: 220-224.
- Gardner, C. 1997. Options for humanely immobilizing and killing crabs. *Journal of Shellfish Research* **16**: 219-224.
- Geiger, C. (2007) Die "Hellabrunner Mischung" im Vergleich mit MS 222 als Tauchbadnarkose bei verschiedenen Fischen. In: *Tierpark Hellabrunn*. pp. 120. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- GholipourKanani, H. & Ahadizadeh, S. 2013. Use of propofol as an anesthetic and its efficacy on some hematological values of ornamental fish *Carassius auratus*. *SpringerPlus* **2**: 2-5.
- Gilderhus, P. A. & Marking, L. L. 1987. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management* **7**: 288-292.
- Gohar, H. A. F. 1937. The preservation of contractile marine animals in an expanded condition. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*: 295-299.
- Hajek, G. J., Choczewski, M., Dziaman, R. & Klyszejko, B. 2009. Evaluation of immobilizing methods for the chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Milne-Edwards). *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* **12**: 1-5.
- Halsband, E. 1956. Die Beziehung zwischen Intensität und Zeitdauer des Reizes bei der elektrischen Durchströmung von Fischen. *Archiv für Fischereiwissenschaft* **6**: 74-81.
- Hara, K. & Sata, T. 2007. The effects of the local anesthetics lidocaine and procaine on glycine and gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesthesia and Analgesia* **104**: 1434-1439.
- Hattingh, J. 1977. The effect of tricaine methanesulphonate (MS-222) on the microhaematocrit of fish blood. *Journal of Fish Biology* **10**: 453-455.
- Hunn, J. B. & Willford, W. A. 1970. The effect of anesthetization and urinary bladder catheterization on renal function of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology* **33**: 805-812.
- James, M. F. 2009. Magnesium: an emerging drug in anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia* **103**: 465-467.
- Kiessling, A., Johansson, D., Zahl, I. H. & Samuelsen, O. B. 2009. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. *Aquaculture* **286**: 301-308.
- Krogh, A. 1914. Ethyl urethane as a narcotic for aquatic animals.
- Leach, M. C., Bowell, V. A., Allan, T. F. & Morton, D. B. 2002. Degrees of aversion shown by rats and mice to different concentrations of inhalational anaesthetics. *Veterinary Record* **150**: 808-815.
- Lebrun, B. & Cattaert, D. 1997. Slow inhibition of Na⁺ current in crayfish axons by 2-(1Non-8enyl)-5-(1Non-

- 8enyl)Pyrrolidine (Pyr9), a synthetic derivative of an ant venom alkaloid. *The Journal of Experimental Biology* **200**: 2097-2106.
- Lo Bianco, S. 1899. The methods employed at the Naples Zoological Station for the preservation of marine animals. *Bulletin of the United States National Museum Part M*: 3-42.
- McFarland, W. N. 1959. A study of the effects of anesthetics on the behaviour and physiology of fishes. *Publications of the Institute of Marine Science* **6**: 22-55.
- McKay, C. R. & Hartzband, D. J. 1970. Propylene phenoxetol: narcotic agent for unsorted benthic invertebrates. *Transactions of the American Microscopical Society* **89**: 53-54.
- McKenzie, J. D., Calow, P. & Nimmo, W. S. 1992. Effects of inhalational general anaesthetics on intact *Daphnia magna* (Cladocera: Crustacea). *Comparative Biochemistry and Physiology C* **101**: 9-13.
- Messenger, J. B. & Ryan, K. P. 1985. Magnesium chloride as an anaesthetic for cephalopods. *Comparative Biochemistry and Physiology C* **82**: 203-205.
- Oetinger, F. C. (2003) Betäubung von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit Nelkenöl und BHA - Stressbelastung und Produktqualität. In: *Tierärztliche Fakultät*. pp. Ludwig-Maximilian-Universität, München.
- Onabamiro, S. D. 1950. A technique for studying infection of *Dranunculus* in *Cyclops*. *Nature* **4184**: 31.
- Oswald, R. L. 1977. Immobilization of decapod crustaceans for experimental procedures. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **57**: 715-721.
- Quesada, R. J., Smith, C. D. & Heard, D. J. 2011. Evaluation of Parenteral Drugs for Anesthesia in the Blue Crab (*Callinectes sapidus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **42**: 295-299.
- Randolph, H. 1900. Chloretone (Acetonchloroform): an anesthetic and macerating agent for lower animals. *Zoologischer Anzeiger* **23**: 436-439.
- Robotti, C. & Lovisolo, D. 1972. Pyrophosphate and ethylenediaminetetraacetat as relaxants for lower invertebrates prior to fixation. *Stain Technology* **47**: 37-38.
- Saraco, M. G. & Maldonaldo, H. 1995. Ethanol effects context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **51**: 223-229.
- Schauf, C. & Agin, D. 1969. Cooperative effect of certain anaesthetics on the lobster giant axon. *Nature* **768-769**: 76.
- Schmit, O. & Mezquita, F. 2010. Experimental test on the use of MS-222 for ostracod anesthesia: concentration, immersion period and recovery time. *Journal of Limnology* **69**: 350-352.
- Schwartz, F. J. 1966. Use of M.S. 222 in anesthetizing and transporting the sand shrimp. *The Progressive Fish-Culturist* **28**: 232-234.
- Spira, M. E., Yarom, Y. & Zeldes, D. 1984. Neuronal interactions mediated by neurally evoked changes in the extracellular potassium concentration. *The Journal of Experimental Biology* **112**: 179-197.
- Suquet, M., de Kermoisan, G., Araya, R. G., Queau, I., Lebrun, L., Le Souchu, P. & Mingant, C. 2009. Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* **22**: 29-34.
- Tomsic, D. & Maldonaldo, H. 1990. Central effect of morphine pretreatment on short- and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **36**: 787-793.
- Tomsic, D., Maldonaldo, H. & Rakitin, A. 1991. Morphine and GABA: effects on perception, escape response and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Research Bulletin* **26**: 699-706.
- Topic Popovic, N., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Barisic, J., Jadan, M., Persin Berakovic, A. & Sauerborn Klobucar, R. 2012. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. *Journal of Applied Ichthyology* **28**: 553-564.
- Venarsky, M. P. & Wilhelm, F. M. 2006. Use of clove oil to anaesthetize freshwater amphipods. *Hydrobiologia* **568**: 425-432.
- Vermeer, G. K. 1986. Effects of air exposure on desiccation rate, haemolymph chemistry, and escape behavior of the spiny lobster *Panulirus argus*. *Fischery Bulletin* **85**: 45-51.
- Walters, N. J. & Uglow, R. F. 1981. Haemolymph magnesium and relative heart activity of some species of marine crustaceans. *The Journal of Experimental Biology* **55**: 255-265.
- Wittmann, A. C., Portner, H. O. & Sartoris, F. J. 2012. A role for oxygen delivery and extracellular magnesium in limiting cold tolerance of the sub-antarctic stone crab *Paralomis granulosa*? *Physiological and Biochemical Zoology* **85**: 285-298.
- Wiwatpanit, T., Powers, B. & Dickinson, P. S. 2012. Inter-animal variability in the effects of C-type allatostatin on the cardiac neuromuscular system in the lobster *Homarus americanus*. *The Journal of Experimental Biology* **215**: 2308-2318.
- Wyeth, R. C., Croll, R. P., Willows, A. O. & Spencer, A. N. 2009. 1-Phenoxy-2-propanol is a useful anaesthetic for gastropods used in neurophysiology. *Journal of Neuroscience Methods* **176**: 121-128.

Literatur generell über Krebse u.a. Gruppen, Temperatur, Verhalten, Neurobiologie usw.

- Aagaard, A., Andersen, B. B. & Depledge, M. H. 1991. Simultaneous monitoring of physiological and behavioural activity in marine organisms using non-invasive, computer-aided technique. *Marine Ecology Progress Series* **73**: 277-282.
- Aaser, C. S. 1949. Avliving av hummer. *Nordisk Veterinaer Medisin* **1**: 221-226.
- Abbott, N. J., Lane, N. J. & Bundgaard, M. 1986. The blood-brain interface in invertebrates. *Annals of the NY Academy of Sciences* **481**: 20-42.
- Aguzzi, J., Abello, P. & Depledge, M. H. 2004. Endogenous cardiac activity rhythms of continental slope *Nephrops norvegicus* (Decapoda: Nephropidae). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **37**: 55-64.
- Ahsanullah, M. & Newell, R. C. 1971. Factors affecting the heart rate of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology A* **39**: 277-287.
- Aiken, D. E. 1973. Proecdyses, setal development, and molt prediction in the American lobster (*Homarus americanus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **30**: 1337-1344.
- Altner, H. & Loftus, R. 1985. Ultrastructure and function of insect thermo- and hygroreceptors. *Annual Reviews of Entomology* **30**: 273-295.
- Altner, H. & Prillinger, L. 1980. Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance. *International Review of Cytology* **67**: 70-139.
- Bakhmet, I. N., Komendantov, A. J. & Smurov, A. O. 2012. Effect of salinity change on cardiac activity in *Hirtella arctica* and *Modiolus modiolus*, in the White Sea. *Polar Biology* **35**: 143-148.
- Baksh, K. (2011) A quantitative study of the effect of temperature on the toxicity of copper to *Metamysidopsis insularis*. In: *Faculty of Science and Agriculture*. pp. Universities of the West Indies, St. Augustine, Trinidad and Tobago.
- Barbieri, E. & Doi, S. A. 2011. The effects of different temperature and salinity levels on the acute toxicity of zinc in the Pink Shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **44**: 251-263.
- Barnes, H. & Barnes, M. 1969. Seasonal changes in the acutely determined oxygen consumption and effects of temperature for three common cirripedes, *Balanus balanoides* (L.), *B. balanus* (L.) and *Chthamalus stellatus* (Poli). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **4**: 36-50.
- Barrento, S., Marques, A., Vaz-Pires, P. & Nunes, M. L. 2012. Physiological changes during simulated live transport of *Cancer pagurus* and recovery in holding tanks. *Aquaculture Research* **43**: 1415-1426.
- Barrento, S., Marques, A., Vaz-Pires, P. & Nunes, M. N. 2009. Live shipment of immersed crab *Cancer pagurus* from England to Portugal and recovery in stocking tanks: stress parameter characterization. *ICES Journal of Marine Science* **67**: 435-443.
- Barton, B. A. & Iwama, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Reviews of Fish Diseases*: 3-26.
- Bernardi, C., Baggiani, L., Tirloni, E., Stella, S., Colombo, F., Moretti, V. M. & Cattaneo, P. 2015. Hemolymph parameters as physiological biomarkers in American lobster (*Homarus americanus*) for monitoring the effects of two commercial maintenance methods. *Fisheries Research* **161**: 280-284.
- Bevengut, M., Clarac, F. & Cattaert, D. 1997. Antidromic modulation of a proprioceptor sensory discharge in crayfish. *Journal of Neurophysiology* **78**: 1180-1183.
- Bickmeyer, U. 2012. The alkaloid Ageladine A, originally isolated from marine sponges, used for pH-sensitive imaging of transparent marine animals. *Marine Drugs* **10**: 223-233.
- Bierbower, S. M. & Cooper, R. L. 2009. Measures of heart and ventilatory rates in freely moving crayfish. *Journal of Visualized Experiments* **32**.
- Bierman, H. S. & Tobin, A. E. 2009. Gross dissection of the stomach of the lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Visualized Experiments*.
- Bittner, G. D. & Johnson, A. L. 1974. Degeneration and regeneration in crustacean peripheral nerves. *Journal of Comparative Physiology* **89**: 1-21.
- Blessing, J. J., Marshall, J. C. & Balcombe, S. R. 2010. Humane killing of fishes for scientific research: a comparison of two methods. *Journal of Fish Biology* **76**: 2571-2577.
- Bodo, M. 2010. Studies in rheoencephalography (REG). *Journal of Electrical Bioimpedance* **1**: !(-\$=.
- Bojsen, B. H., Witthøfft, H., Styrihave, B. & Andersen, O. 1998. *In situ* studies on heart rate and locomotor activity in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* (L.) in relation to natural fluctuations in temperature and light intensity. *Freshwater Biology* **39**: 455-465.
- Brett, J. R. 1956. Some principles in the thermal requirements of fishes. *The Quarterly Review of Biology* **31**: 75-87.
- Bückle-Ramirez, L. F., Herrera, F. D., Correa Sandoval, F., Baron Sevilla, B. & Hernandez Rodriguez, M. 1994. Diel thermoregulation of the crawfish *Procambarus clarkii* (Crustacea, Cambaridae). *Journal of Thermal Biology* **19**: 419-422.

- Bullock, T. H. 1956. Compensation for temperature in the metabolism and activity of poikilotherms. *Biological Reviews* **30**: 311-342.
- Burkenroad, M. D. 1981. The higher taxonomy and evolution of decapoda (Crustacea). *Transactions of the San Diego Society of Natural History* **19**: 251-268.
- Burmistrov, Y. & Shuranova, Z. P. 2007. "Circulation" of nerve impulse in lateral giant axons of the crayfish: a remnant of an evolutionary past? *Crustaceana* **80**: 847-860.
- Burnett, N. P., Seabra, R., de Pirro, M., Wetthey, S. D., Woodin, S. A., Helmuth, B., Zippay, M. L., Sara, G., Monaco, C. & Lima, F. P. 2013. An improved noninvasive method for measuring heartbeat of intertidal animals. *Limnology and Oceanography: Methods* **11**: 91-100.
- Burnovicz, A., Olivia, D. & Hermitte, G. 2009. The cardiac response of the crab *Chasmagnathus granulatus* as an index of sensory perception. *The Journal of Experimental Biology* **212**: 313-324.
- Camacho, J., Qadri, S. A., Wang, H. & Worden, M. K. 2006. Temperature acclimation alters cardiac performance in the lobster *Homarus americanus*. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* **192**: 1327-1334.
- Caplan, J. S., Williams, A. H. & Marder, E. 2014. Many parameter sets in a multicompartiment model oscillator are robust to temperature perturbations. *The Journal of Neuroscience* **34**: 4963-4975.
- Carter, T. J. & Fraser, P. J. 1991. Effects of temperature on the tilt evoked swimming in the crabs *Carcinus* and *Macropipus*. *Journal of Thermal Biology* **16**: 367-375.
- Casterlin, M. E. & Reynolds, W. W. 1977. Behavioral fever in crayfish. *Hydrobiologia* **56**: 99-101.
- Cattaert, D. & Le Ray, D. 2001. Adaptive motor control in crayfish. *Progress in Neurobiology* **63**: 199-240.
- Chen, S., Wu, J. & Malone, R. F. 1995. Effects of temperature on mean molt interval, molting and mortality of red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*). *Aquaculture* **131**.
- Chrachri, A., Neil, D. & Mulloney, B. 1994. State-dependent responses of two motor systems in the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Comparative Physiology A* **175**: 371-380.
- Cohen, M. J. 1955. The function of receptors in the statocyst of the lobster *Homarus americanus*. *Journal of Physiology* **130**: 9-34.
- Cole, W. H. 1941. A perfusing solution for the lobster (*Homarus*) heart and the effect of its constituent ions on the heart. *Journal of General Physiology* **25**: 1-6.
- Comeau, M. & Benhalima, K. 2009. Internal organ pathology of wild American lobster (*Homarus americanus*) from eastern Canada affected with shell disease. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **43**: 257-269.
- Cooper, R. M., Schapker-Finucane, H., Adami, M. & Cooper, R. L. 2011. Heart and ventilatory measures in crayfish during copulation. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology* **1**: 36-42.
- Cowan, D. F., Watson, W. H., Solow, A. R. & Mountcastle, A. M. 2006. Thermal histories of brooding lobsters, *Homarus americanus*, in the Gulf of Maine. *Marine Biology* **150**: 463-470.
- Crawshaw, L. I. 1974. Temperature selection and activity in the Crayfish, *Orconectes immunis*. *Journal of Comparative Physiology* **95**: 315-322.
- Crisp, D. J. & Ritz, D. A. 1967. Temperature acclimation in barnacles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1**: 236-256.
- Crossin, G. T., Al-Ayoub, S. A., Jury, S. H., Hunting Howell, W. & Watson III, W. H. 1998. Behavioral thermoregulation in the american lobster *Homarus americanus*. *The Journal of Experimental Biology* **201**: 365-374.
- Cruz-Bermudez, N. D. & Marder, E. 2007. Multiple modulators act on the cardiac ganglion of the crab, *Cancer borealis*. *The Journal of Experimental Biology* **210**: 2873-2884.
- Cuculescu, M., Hyde, D. & Bowler, K. 1995. Temperature acclimation of marine crabs: changes in plasma membrane fluidity and lipid composition. *Journal of Thermal Biology* **20**: 207-222.
- Cuculescu, M., Hyde, D. & Bowler, K. 1998. Thermal tolerance of two species of marine crab, *Cancer pagurus* and *Carcinus maenas*. *Journal of Thermal Biology* **23**: 107-110.
- Cuculescu, M., Pearson, T., Hyde, D. & Bowler, K. 1999. Heterothermal acclimation: an experimental paradigm for studying the control of thermal acclimation in crabs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6501-6505.
- Dalton, J. C. & Hendrix, D. E. 1962. Effects of temperature on membrane potentials of lobster giant axon. *American Journal of Physiology* **202**: 491-494.
- Dauscher, H. & Flindt, R. 1969. Vergleichende Untersuchungen zur Herzstätigkeit bei frei beweglichen dekapoden Krebsen (*Astacus fluviatilis* Fab., *Astacus leptodactylus* Eschscholz and *Cambarus affinis* Say). *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* **62**: 291-300.
- de Wachter, B. & Wilkens, J. L. 1996. Comparison of temperature effects on heart performance of the dungeness crab, *Cancer magister*, *in vitro* and *in vivo*. *Biological Bulletin* **190**: 385-395.
- Depledge, M. H. 1984. Photoplethymography - a non-invasive technique for monitoring heart beat and ventilation

- rate in decapod crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **77**: 369-371.
- Depledge, M. H. & Andersen, B. B. 1990. A computer-aided physiological monitoring system for continuous, long-term recording of cardiac activity in selected invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **96**: 473-477.
- Derby, C. D. & Blaustein, D. N. 1988. Morphological and physiological characterization of individual olfactory interneurons connecting the brain and eyestalk ganglia of the crayfish. *Journal of Comparative Physiology A* **163**: 777-794.
- Doujak, F. E. 1985. Can a shore crab be a star? *The Journal of Experimental Biology* **116**: 385-393.
- Dowds, B. M. & Elwood, R. W. 1985. Shell war II: the influence of relative size on decisions made during hermit crab shell fights. *Animal Behaviour* **33**: 649-656.
- Dufort, C. G., Jury, S. H., Newcomb, J. M., O'Grady III, D. F. & Watson III, W. H. 2001. Detection of salinity by the lobster, *Homarus americanus*. *Biological Bulletin* **201**: 424-434.
- Dyer, M. F. & Uglow, R. F. 1977. On a technique for monitoring heart and scaphognathite activity in natantia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **27**: 117-124.
- Dyuzen, I. V., Kotsyuba, E. P. & Lamash, N. E. 2012. Changes in the nitric oxide system in the shore crab *Hemigrapsus sanguineus* (Crustacea, Decapoda) CNS induced by a nociceptive stimulus. *The Journal of Experimental Biology* **215**: 2668-2676.
- Edwards, D. H., Heitler, W. J. & Krasne, F. B. 1999. Fifty years of a command neuron: the neurobiology of escape behavior in the crayfish. *Trends in Neurosciences* **22**: 153-161.
- Engel, J. E. & Wu, C. F. 1996. Altered habituation of an identified escape circuit in *Drosophila* memory mutants. *Journal of Neuroscience* **16**: 3486-3499.
- Erikson, U., Lambooj, B., Digre, H., Reimert, H. G. M., Bondø, M. & der Vis, H. v. 2012. Conditions for instant electrical stunning of farmed Atlantic cod after de-watering, maintenance of unconsciousness, effects of stress, and fillet quality — A comparison with AQUI-S™. *Aquaculture* **324-325**: 135-144.
- Espina, S., Herrera, F. D. & Bückle, L. F. 1993. Preferred and avoided temperatures in the crawfish *Procambarus clarkii* (Decapoda, Cambaridae). *Journal of Thermal Biology* **18**: 35-39.
- Espinoza, S. Y., Breen, L., Varghese, N. & Faulkes, Z. 2006. Loss of escape-related giant neurons in a spiny lobster, *Panulirus argus*. *Biological Bulletin* **211**: 223-231.
- Fedotov, V. P., Zhuravlev, V. L., Khalatov, A. N. & Kholodkevich, S. V. 2009. Comparative analysis of heart activity of the crayfish *Pontastacus leptodactylus* by methods of plethysmography and electrocardiography. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* **45**: 527-529.
- Field, L. H. & Larimer, J. L. 1975. The cardioregulatory system of the crayfish: neuroanatomy and physiology. *Journal of Experimental Biology* **62**: 519-530.
- Findlay, I. & McVean, A. 1977. The nervous control of limb autotomy in the hermit crab *Pagurus bernhardus* (L.) and the role of the cuticular stress detector, CSD₁. *The Journal of Experimental Biology* **70**: 93-104.
- Fossat, P., Bacque-Cazenave, J., De Deurwaerdere, P., Delbecque, J.-P. & Cattaert, D. 2014. Anxiety-like behavior in crayfish is controlled by serotonin. *Science* **344**: 1293-1297.
- Fuentes-Pardo, B. & Rubio, V. I. 1981. Correlation between motor and electroretinographic circadian rhythms in the crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comparative Biochemistry and Physiology A* **68**: 477-485.
- Gruhn, M. & Rathmayer, W. 2002. An implantable electrode design for both chronic in vivo nerve recording and axon stimulation in freely behaving crayfish. *Journal of Neuroscience Methods* **118**: 33-40.
- Hall jr., L. W., Cincotta, D. A., Stauffer, J. R. & Hocutt, C. H. 1978. Temperature preference of the crayfish *Orconectes obscurus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **7**: 379-383.
- Hamilton, J. L., Edwards, C. R., Holt, S. R. & Worden, M. K. 2007. Temperature dependent modulation of lobster neuromuscular properties by serotonin. *Journal of Experimental Biology* **210**: 1025-1035.
- Harris-Warrick, R. M., Flamm, R. F., Johnson, B. R. & Katz, P. S. 1989. Modulation of neural circuits in crustacea. *American Zoologist* **29**.
- Harzsch, S. 2003. Ontogeny of the ventral nerve cord in malacostracan crustaceans: a common plan for neuronal development in crustacea, hexapoda and other arthropoda? *Arthropod Structure & Development* **32**: 17-37.
- Hemsworth, P. H., Fischer, A. D., Mellor, D. J. & Johnson, C. B. 2009. A scientific comment on the welfare of sheep slaughtered without stunning. *Animal Welfare Science Center Australia*.
- Herberholz, J. 2004. Escape behavior and escape circuit activation in juvenile crayfish during prey-predator interactions. *Journal of Experimental Biology* **207**: 1855-1863.
- Herrera, F. D., Uribe, E. S., Bückle-Ramirez, L. F. & Mora, A. G. 1998. Critical thermal maxima and minima of *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Thermal Biology* **23**: 381-385.
- Hessen-Forst (2009) Artensteckbrief Edelkrebs (*Astacus astacus*). pp. FENA Servicestelle für Forsteinrichtung und Naturschutz.
- Holley, A. & Delaleu, J. C. 1972. Electrophysiology of the heart of an isopod crustacean: *Porcellio dilatatus*. *Journal of*

- Experimental Biology* **57**: 589-608.
- Holzman, N. & McManus, J. J. 1973. Effects of acclimation on metabolic rate and thermal tolerance in the carpenter frog, *Rana vergatipes*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **45**: 833-842.
- Hong, S. T., Bang, S., Hyun, S., Kang, J., Jeong, K., Paik, D., Chung, J. & Kim, J. 2008. cAMP signalling in mushroom bodies modulates temperature preference behaviour in *Drosophila*. *Nature* **454**: 771-775.
- Hopkin, R. S., Qari, S., Bowler, K., Hyde, D. & Cuculescu, M. 2006. Seasonal thermal tolerance in marine crustacea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **331**: 74-81.
- Hovel, K. & Wahle, R. A. 2010. Effects of habitat patchiness on American lobster movement across a gradient of predation risk and shelter competition. *Ecology* **91**: 1993-2002.
- Jackson, D. J. & MacMillan, D. L. 2000. Tailflip escape behavior in larval and juvenile lobsters (*Homarus americanus*) and crayfish (*Cherax destructor*). *Biological Bulletin* **198**: 307-318.
- Jacobs, J. R. & Atwood, H. L. 1981. Effects of thermal history on long term neuromuscular facilitation in intact crayfish and isolated claw preparations. *Journal of Comparative Physiology* **143**: 53-60.
- Jury, S. H. & Watson III, W. H. 2000. Thermosensitivity of the lobster, *Homarus americanus*, as determined by cardiac assay. *Biological Bulletin* **199**: 257-264.
- Kamio, M., Araki, M., Nagayama, T., Matsunaga, S. & Fusetani, N. 2005. Behavioral and electrophysiological experiments suggest that the antennular outer flagellum is the site of pheromone receptor in the male helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *Biological Bulletin* **208**: 12-19.
- Kelley, A. L., de Rivera, C. E. & Buckley, B. A. 2011. Intraspecific variation in thermotolerance and morphology of the invasive European green crab, *Carcinus maenas*, on the west coast of North America. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **409**: 70-78.
- Kerkut, G. A. & Taylor, B. J. R. 1958. The effect of temperature on the activity of poikilotherms. *Behaviour* **13**: 259-279.
- King, A. J. & Adamo, S. A. 2006. The ventilatory, cardiac and behavioural responses of resting cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) to sudden visual stimuli. *Journal of Experimental Biology* **209**: 1101-1111.
- Kivivuori, L. 1980. Effects of temperature and temperature acclimation on the motor and neural functions in the Crayfish *Astacus astacus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **65**: 297-304.
- Kivivuori, L. (1983) Temperature acclimation of behavioural and neural functions in the crayfish *Astacus astacus* L. In: *Department of Biology*. pp. University of Turku, Turku.
- Kivivuori, L. 1983. Temperature acclimation of walking in the crayfish *Astacus astacus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **75**: 375-378.
- Kivivuori, L. A. 1994. Temperature selection behaviour of cold- and warm- acclimated crayfish [*Astacus astacus* (L.)]. *Journal of Thermal Biology* **19**: 291-297.
- Kongara, K., McIlhone, A. E., Kells, N. J. & Johnson, C. B. 2014. Electroencephalographic evaluation of decapitation of the anaesthetized rat. *Laboratory Animals* **48**: 15-19.
- Konishi, S. & Kravitz, E. A. 1978. The physiological properties of amine-containing neurones in the lobster nervous system. *Journal of Physiology* **279**: 215-229.
- Korhonen, I. A. & Lagerspetz, K. Y. H. 1996. Heat shock response and thermal acclimation in *Asellus aquaticus*. *Journal of Thermal Biology* **21**: 49-56.
- Korn, H. & Faber, D. S. 1996. Escape behavior - Brainstem and spinal cord circuitry and function. *Current Opinion in Neurobiology* **6**: 826-832.
- Kotsyuba, E. P., Dyuizen, I. V. & Lamash, N. E. 2010. Stress-induced changes in the nitric oxide system of shore crabs living under different ecological conditions. *Russian Journal of Marine Biology* **36**: 201-208.
- Lagerspetz, K. Y. & Vainio, L. A. 2006. Thermal behaviour of crustaceans. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **81**: 237-58.
- Lagerspetz, K. Y. H. 1974. Temperature acclimation and the nervous system. *Biological Reviews* **49**: 477-514.
- Laird, C. E. & Haefner Jr, P. A. 1976. Effects of intrinsic and environmental factors on oxygen consumption in the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **22**: 171-178.
- Lambooj, E., Kloosterboer, R. J., Pieterse, C., Gerritzen, M. A. & van de Vis, J. W. 2003. Stunning of farmed African catfish (*Clarias gariepinus*) using a captive needle pistol; assessment of welfare aspects. *Aquaculture Research* **34**: 1353-1358.
- Larimer, J. L. 1962. Responses of the crayfish heart during respiratory stress. *Physiological Zoology* **35**: 179-186.
- Larimer, J. L. 1964. Sensory-induced modifications of ventilation and heart rate in crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology* **12**: 25-36.
- Larimer, J. L. & Moore, D. 2003. Neural basis of a simple behavior: abdominal positioning in crayfish. *Microscopy Research and Technique* **60**: 346-359.
- Larimer, J. L. & Tindel, J. R. 1966. Sensory modifications of heart rate in crayfish. *Animal Behaviour* **14**: 239-245.
- Laverack, M. S. 1988. The number of neurons in decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* **8**: 1-11.
- Layne Jr, J. R., Claussen, D. L. & Manis, M. L. 1987. Effects of acclimation temperature, season, and time of day on

- the critical thermal maxima and minima of the crayfish *Orconectes rusticus*. *Journal of Thermal Biology* **12**: 183-187.
- Lehti-Koivunen, S. M. & Kivivuori, L. A. 1994. Effect of temperature acclimation in the crayfish *Astacus astacus* L. on the locomotor activity during a cyclic temperature change. *Journal of Thermal Biology* **19**: 299-304.
- Lehti-Koivunen, S. M. & Kivivuori, L. A. 1998. Fluidity of neural membranes of crayfish (*Astacus astacus* L.) acclimated to 5°C and 20°C. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **119**: 773-779.
- Lenz, P. H., Hower, A. E. & Hartline, D. K. 2005. Temperature compensation in the escape response of a marine copepod, *Calanus finmarchicus* (Crustacea). *Biological Bulletin* **209**: 75-85.
- Lewis, L. & Ayers, J. 2014. Temperature preference and acclimation in the Jonah Crab, *Cancer borealis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **455**: 7-13.
- Liden, W. H. & Herberholz, J. 2008. Behavioral and neural responses of juvenile crayfish to moving shadows. *The Journal of Experimental Biology* **211**: 1355-1361.
- Liden, W. H., Phillips, M. L. & Herberholz, J. 2010. Neural control of behavioural choice in juvenile crayfish. *Proceedings of the Royal Society. B* **277**: 3493-3500.
- Liotti, M., Brannan, S., Egan, G., Shade, R., Madden, L., Abplanalp, B., Robillard, R., Lancaster, J., Zamparripa, F. E., Fox, P. T. & Denton, D. 2001. Brain response associated with consciousness of breathlessness (air hunger). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 2035-2040.
- Listerman, L. R., Deskins, J., Bradacs, H. & Cooper, R. L. 2000. Heart rate within male crayfish: social interactions and effects of 5-HT. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **125**: 251-263.
- Liu, Y. C. & Herberholz, J. 2010. Sensory activation and receptive field organization of the lateral giant escape neurons in crayfish. *Journal of Neurophysiology* **104**: 675-684.
- Lowery, T. A. & Tate, L. G. 1986. Effect of hypoxia on hemolymph lactate and behavior of blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun in the laboratory and field. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **85**: 689-692.
- Lozada, M., Romano, A. & Maldonado, H. 1990. Long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Physiology and Behavior* **47**: 35-41.
- Macdonald, J. A. 1981. Temperature compensation in the peripheral nervous system: antarctic vs temperate poikilotherms. *Journal of Comparative Physiology* **142**.
- Magee, B. & Elwood, R. W. 2013. Shock avoidance by discrimination learning in the shore crab (*Carcinus maenas*) is consistent with a key criterion for pain. *Journal of Experimental Biology* **216**: 353-358.
- Martin, J. 2009. *Crustacea glossary - complete list*. Natural History Museum, Los Angeles.
- Matheson, K. & Gagnon, P. 2012. Effects of temperature, body size, and chela loss on competition for a limited food resource between indigenous rock crab (*Cancer irroratus* Say) and recently introduced green crab (*Carcinus maenas* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **428**: 49-56.
- McGaw, I. J. 2003. Behavioral thermoregulation in *Hemigrapsus nudus*, the amphibious purple shore crab. *Biological Bulletin* **204**: 38-49.
- McLeese, D. W. 1955. Effects of temperature, salinity and oxygen on the survival of the American lobster. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **13**: 247-272.
- McLeese, D. W. 1956. Effects of temperature, salinity and oxygen on the survival of the American Lobster. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **13**: 247-272.
- McLeese, D. W. & Wilder, D. G. 1958. The activity and catchability of the lobster (*Homarus americanus*) in relation to temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **15**: 1345-1354.
- McVean, A. 1975. Autotomy. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **51**: 497-505.
- Mittal, A. K. & Whitear, M. 1978. A note on cold anaesthesia of poikilotherms. *Journal of Fish Biology* **13**: 519-520.
- Mordhorst, T., Awal, S., Jordan, S., Petters, C., Sartoris, L., Dringen, R. & Bickmeyer, U. 2015. The chemically synthesized Ageladine A-derivative LysoGlow84 stains lysosomes in viable mammalian brain cells and specific structures in the marine flatworm *Macrostomum lignano*. *Marine Drugs* **13**: 920-935.
- Mrosovsky, N. 1973. Temperature and leaning in poikilotherms. *Journal of Theoretical Biology* **39**: 659-663.
- Mulloney, B., Smarandache-Wellmann, C., Weller, C., Hall, W. M. & DiCaprio, R. A. 2014. Proprioceptive feedback modulates coordinating information in a system of segmentally distributed microcircuits. *The Journal of Neurophysiology* **112**: 2799-2809.
- Mulloney, B., Tschuluun, N. & Hall, W. M. 2003. Architectonics of crayfish ganglia. *Microscopy Research and Technique* **60**: 253-265.
- Mundahl, N. D. & Benton, M. J. 1990. Aspects of the thermal ecology of the rusty crayfish *Orconectes rusticus* (Girard). *Oecologia* **82**: 210-216.
- Nagayama, T. & Newland, P. L. 2011. Temperature dependent plasticity of habituation in the crayfish. *Journal of Comparative Physiology A* **197**: 1073-1081.
- Nakyinsige, K., Man, Y. B., Aghwan, Z. A., Zulkifli, I., Goh, Y. M., Abu Bakar, F., Al-Kahtani, H. A. & Sazili, A. Q. 2013. Stunning and animal welfare from Islamic and scientific perspectives. *Meat Science* **95**: 352-361.
- Neil, D. M. & Miyan, J. A. 1986. Phase-dependent modulation of auxiliary swimmeret muscle activity in the

- equilibrium reactions of the norway lobster, *Nephrops norvegicus* L. *Journal of Experimental Biology* **126**: 157-179.
- Newell, R. C. 1966. Effect of temperature on the metabolism of poikilotherms. *Nature* **212**: 426-428.
- Newell, R. C. & Bayne, B. L. 1973. A review on temperature and metabolic acclimation in intertidal marine invertebrates. *Netherlands Journal of Sea Research* **7**: 421-433.
- Newland, P. L., Aonuma, H. & Nagayama, T. 2000. The role of proprioceptive signals in the crayfish escape circuit. *Zoological Science* **17**: 1185-1195.
- Newland, P. L., Aonuma, H., Sato, M. & Nagayama, T. 1996. Presynaptic inhibition of exteroceptive afferents by proprioceptive afferents in the terminal abdominal ganglion of the crayfish. *Journal of Neurophysiology* **76**: 1047-1058.
- Novak, T., Šajna, N., Antolinc, E., Lipovšek, S., Devetak, D. & Janžekovič, F. 2014. Cold tolerance in terrestrial invertebrates inhabiting subterranean habitats. *International Journal of Speleology* **43**: 265-272.
- Onken, H., Graszynski, K., Johannsen, A., Putzenlechner, M., Riestenpatt, S., Schirmer, C., Siebers, D. & Zeiske, W. 1995. How to overcome osmotic stress? Marine crabs conquer freshwater. New insights from modern electrophysiology. *Helgoländer Meeruntersuchungen* **49**: 715-725.
- Pampapathi Rao, K. 1961. Physiology of acclimatisation to low temperature in poikilotherms. *Science* **137**: 682-683.
- Panksepp, J. B. & Huber, R. 2004. Ethological analyses of crayfish behavior: a new invertebrate system for measuring the rewarding properties of psychostimulants. *Behavioural Brain Research* **153**: 171-180.
- Pantin, C. F. A. 1962. *Notes on microscopical techniques for zoologists*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Patterson, L., Dick, J. T. A. & Elwood, R. W. 2007. Physiological stress responses in the edible crab, *Cancer pagurus*, to the fishery practice of de-clawing. *Marine Biology* **152**: 265-272.
- Paul, D. H., Faulkes, Z. & Antonsen, B. L. (2002) Synergies between disparate motor systems: Loci for behavioral evolution. In: *Crustacean experimental systems in neurobiology*, (Wiese, K., ed.). pp. 263-284. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Payette, A. L. & McGaw, I. J. 2003. Thermoregulatory behavior of the crayfish *Procambarus clarki* in a burrow environment. *Comparative Biochemistry and Physiology. A* **136**: 539-556.
- Pearson, T., Hyde, D. & Bowler, K. 1999. Heterologous acclimation: a novel approach to the study of thermal acclimation in the crab *Cancer pagurus*. *American Journal of Physiology* **227**: R24-R30.
- Peck, L. S., Morley, S. A., Richard, J. & Clark, M. S. 2014. Acclimation and thermal tolerance in Antarctic marine ectotherms. *The Journal of Experimental Biology* **217**: 16-22.
- Pichon, Y., Sattelle, D. B. & Lane, N. J. 1972. Conduction processes in the nerve cord of the moth *Manduca sexta* in relation to its ultrastructure and haemolymph ionic composition. *The Journal of Experimental Biology* **56**: 717-734.
- Pollard, T. G. & Larimer, J. L. 1977. Circadian rhythmicity of heart rate in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **57**: 221-226.
- Prosser, C. L. & Farhi, E. 1965. Effects of temperature on conditioned reflexes and on nerve conduction in fish. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* **50**.
- Putnam, R. W. & Bennett, A. F. 1981. Thermal dependence of behavioural performance of anuran amphibians. *Animal Behaviour* **29**: 502-509.
- Qadri, S. A., Camacho, J., Wang, H., Taylor, J. R., Grosell, M. & Worden, M. K. 2007. Temperature and acid-base balance in the American lobster *Homarus americanus*. *The Journal of Experimental Biology* **210**: 1245-1254.
- Raj, B. S. D. & Murray, R. W. 1962. Non-myelinated nerves as a model for thermoreceptors. *Comparative Biochemistry and Physiology* **5**: 311-317.
- Ravaux, J., Leger, N., Rabet, N., Morini, M., Zbinden, M., Thatje, S. & Shillito, B. 2012. Adaptation to thermally variable environments: capacity for acclimation of thermal limit and heat shock response in the shrimp *Palaemonetes varians*. *Journal of Comparative Physiology B* **182**: 899-907.
- Reiser, S., Herrmann, J.-P. & Temming, A. 2014. Thermal preference of the common brown shrimp (*Crangon crangon*, L.) determined by the acute and gravitational method. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **461**: 250-256.
- Reynolds, W. W. & Casterlin, M. E. 1979. Behavioral thermoregulation and activity in *Homarus americanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **64**: 25-28.
- Rezer, E. & Moulins, M. 1983. Expression of the crustacean pyloric pattern generator in the intact animal. *Journal of Comparative Physiology* **153**: 17-28.
- Robb, D. H. F., Wotton, S. B., McKinsty, J. L., Sørensen, N. K. & Kestin, S. C. 2000. Commercial slaughter method used on Atlantic salmon: determination of the onset of brain failure by electroencephalography. *The Veterinary Record* **147**: 298-303.
- Roberts, J. L. 1957. Thermal acclimation of metabolism in the crab *Pachygrapsus crassipes* Randall. I. The influence of body size, starvation, and molting. *Physiological Zoology* **30**: 232-242.

- Roberts, J. L. 1957. Thermal acclimation of metabolism in the crab *Pachygrapsus crassipes* Randall. II. Mechanisms and the influence of season and latitude. *Physiological Zoology* **30**: 242-255.
- Robertson, R. M. & Money, T. G. 2012. Temperature and neuronal circuit function: compensation, tuning and tolerance. *Current Opinion in Neurobiology* **22**: 724-734.
- Robinson, N. J., Thatje, S. & Osseforth, C. 2009. Heartbeat sensors under pressure: a new method for assessing hyperbaric physiology. *High Pressure Research* **29**: 422-430.
- Robinson, R. 2010. Firing hot, firing cold: how poikilotherms compensate for temperature swings. *PLoS Biology* **8**: e1000470.
- Rooney, D. J. & Laming, P. R. 1986. Cardiac and ventilatory arousal responses and their habituation in goldfish: effects of the intensity of the eliciting stimulus. *Physiology and Behavior* **37**: 11-14.
- Rose, R. A., MacDougall, K., Patel, A., Wilkens, J. L. & Walker, R. I. 2001. Effects of walking on ventilatory and cardiac function in intact and cardiac-impaired lobsters. *Physiological and Biochemical Zoology* **74**: 102-110.
- Roth, B., Birkeland, S. & Oyarzun, F. 2009. Stunning, pre slaughter and filleting conditions of Atlantic salmon and subsequent effect on flesh quality on fresh and smoked fillets. *Aquaculture* **289**: 350-356.
- Roye, D. B., Kilroy, C. M., Doyle, J. M. & Reuss, L. E. 2000. Decussating interneurons mediate antennular withdrawal in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Crustacean Biology* **20**: 603-613.
- Sandeman, D. C. & Okajima, A. 1972. Statocyst-induced eye movements in the crab *Scylla serrata*. *Journal of Experimental Biology* **57**: 187-204.
- Santini, G., De Pirro, M. & Chelazzi, G. 1999. *In situ* and laboratory assessment of heart rate in a mediterranean limpet using a noninvasive technique. *Physiological and Biochemical Zoology* **72**: 198-204.
- Santini, G., Williams, G. A. & Chelazzi, G. 2000. Assessment of factors affecting heart rate of the limpet *Patella vulgata* on the natural shore. *Marine Biology* **137**: 291-296.
- Santos, E. A., Keller, R., Rodriguez, R. & Lopez, L. 2001. Effects of serotonin and fluoxetine on blood glucose regulation in two decapod species. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **34**: 75-80.
- Schapker, H., Breithaupt, T., Schuranova, Z., Burmistrov, Y. & Cooper, R. L. 2002. Heart and ventilatory measures in crayfish during environmental disturbances and social interactions. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **131**: 397-407.
- Schofield, P. K., Swales, L. S. & Treherne, J. E. 1984. Potentials associated with the blood-brain barrier of an insect: recordings from identified neuroglia. *The Journal of Experimental Biology* **109**: 307-318.
- Shivers, R. R. 1967. Fine structure of crayfish optic ganglia. *The University of Kansas Science Bulletin* **47**: 677-733.
- Shuranova, Z. P. & Burmistrov, Y. 2006. Albrecht Bethe's contribution to crustacean neuroscience: hundred years ago and today. *Crustaceana* **79**: 99-122.
- Shuranova, Z. P., Burmistrov, Y., Strawn, J. R. & Cooper, R. L. 2006. Evidence for an autonomic nervous system in decapod crustaceans. *International Journal of Zoological Research* **2**: 242-283.
- Siegler, M. V. S. 1984. Local interneurons and local interactions in arthropods. *Journal of Experimental Biology* **112**: 253-281.
- Smaldon, G. & Lee, E. W. 1979. *A synopsis of methods for the narcotisation of marine invertebrates*. Royal Scottish Museum.
- Sneddon, L. U. 2002. Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Neuroscience Letters* **319**: 167-171.
- Somero, G. N. 1995. Proteins and temperature. *Annual Review of Physiology* **57**: 43-68.
- Spanier, E., McKenzie, T. P., Cobb, J. S. & Clancy, M. 1998. Behavior of juvenile American lobster, *Homarus americanus*, under predation risk. *Marine Biology* **130**: 397-406.
- Spanoghe, P. T. & Bourne, P. K. 1997. Relative influence of environmental factors and processing techniques on *Panulirus cygnus* morbidity and mortality during simulated live shipments. *Marine Freshwater Research* **48**: 839-844.
- Spirito, C. P. 1975. The organization of the crayfish oesophageal nervous system. *Journal of Comparative Physiology* **102**: 237-249.
- Sprague, J. B. 1963. Resistance of four freshwater crustaceans to lethal high temperature and low oxygen. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **20**: 387-415.
- Stead, N. 2013. Inside JEB - Painful feelings in crabs. *Journal of Experimental Biology*.
- Stenseng, E., Braby, C. E. & Somero, G. N. 2005. Evolutionary and acclimation-induced variation in the thermal limits of heart function in congeneric marine snails (genus *Tegula*): Implications for vertical zonation. *Biological Bulletin* **208**.
- Stentiford, G. D., Neil, D. M., Atkinson, R. J. A. & Bailey, N. 2000. An analysis of swimming performance in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* L. infected by a parasitic dinoflagellate of the genus *Hematodinium*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **247**: 169-181.
- Stepanyan, R., Hollins, B., Brock, S. E. & McClintock, T. S. 2004. Primary culture of lobster (*Homarus americanus*) olfactory sensory neurons. *Chemical Senses* **29**: 179-187.

- Stephens, P. J. 1985. The effects of temperature and acclimation on crustacean nerve-muscle physiology. *Biological Bulletin* **169**: 92-105.
- Stephens, P. J. 1985. Temperature effects on a slow-crustacean neuromuscular system. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **82**: 591-595.
- Stephens, P. J. 1990. The effects of temperature on the physiology of crustacean nerves and muscles. *Journal of Thermal Biology* **15**: 15-24.
- Stopfer, M. & Carew, T. J. 1996. Heterosynaptic facilitation of tail sensory neuron synaptic transmission during habituation in tail-induced tail and siphon withdrawal reflexes of *Aplysia*. *Journal of Neuroscience* **16**: 4933-4948.
- Stork, T., Engelen, D., Krudewig, A., Silies, M., Bainton, R. J. & Klambt, C. 2008. Organization and function of the blood-brain barrier in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* **28**: 587-597.
- Strange, R. J. 1980. Acclimation Temperature influences cortisol and glucose concentrations in stressed channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society* **109**: 298-303.
- Styrishave, B., Andersen, O. & Depledge, M. H. 2003. In situ monitoring of heart rates in shore crabs *Carcinus maenas* in two tidal estuaries: effects of physico-chemical parameters on tidal and diel rhythms. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **36**: 161-175.
- Tang, L. S., Taylor, A. L., Rinberg, A. & Marder, E. 2012. Robustness of a rhythmic circuit to short- and long-term temperature changes. *The Journal of Neuroscience* **32**: 10075-10085.
- Tani, M. & Kuramoto, T. 1998. Cool-sensitive neurons in the ventral nerve cord of crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **119**: 845-852.
- Tani, M. & Kuramoto, T. 1998. Effects of cooling on the abdominal ganglion muscle preparation of macruran decapod crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **119**: 861-868.
- Tautz, J. 1987. Interneurons in the tritocerebrum of the crayfish. *Brain Research* **407**: 230-239.
- Taylor, A. C. 1977. The respiratory responses of *Carcinus maenas* (L.) to changes in environmental salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **29**: 197-210.
- Taylor, E. W. 1981. Some effects of temperature on respiration in decapod crustaceans. *Journal of Thermal Biology* **6**: 239-248.
- Taylor, E. W. & Wheatly, M. G. 1979. The behaviour and respiratory physiology of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) at moderately high temperatures. *Journal of Comparative Physiology B* **130**: 309-316.
- Trushenski, J., Schwarz, M., Takeuchi, R., Delbos, B. & Sampaio, L. A. 2010. Physiological responses of cobia *Rachycentron canadum* following exposure to low water and air exposure stress challenges. *Aquaculture* **307**: 173-177.
- van de Meer, J. (2004) Adenosin und Urat modulieren die Sauerstoffversorgung des Sumpfkrebsses *Astacus leptodactylus*. In: *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*, Vol. Dissertation. pp. Heinrich Heine Universität, Düsseldorf.
- Verbitskii, V. B. & Verbitskaya, T. I. 2011. Final thermal preference in parthenogenetic females of *Daphnia magna* *straus* (Crustacea: Cladocera) acclimated to various temperatures. *Biology Bulletin* **38**: 493-499.
- Verbitskii, V. B. & Verbitskaya, T. I. 2012. Thermal preference and avoidance in cladoceran *Daphnia magna* *Strauss* (crustacea, cladocera) acclimated to constant temperature. *Biology Bulletin* **39**: 93-98.
- Verheijen, F. J. & Flight, W. F. G. 1997. Decapitation and brining: experimental tests show that after these commercial methods for slaughtering eel *Anguilla anguilla* (L.), death is not instantaneous. *Aquaculture Research* **28**: 361-366.
- Vigh, L., Maresca, B. & Harwood, J. L. 1998. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 369-374.
- Vogt, G. 2012. Ageing and longevity in the Decapoda (Crustacea): A review. *Zoologischer Anzeiger* **251**: 1-25.
- Waddell, S. 2013. Reinforcement signalling in *Drosophila*; dopamine does it all after all. *Current Opinion in Neurobiology* **23**: 324-329.
- Walker, T. J. 1975. Effect of temperature on rates in poikilotherm nervous systems: evidence from the calling songs of meadow katydids (Orthoptera: Tettigoniidae: *Orchelimum*) and reanalysis of published data. *Journal of Comparative Physiology* **101**: 57-69.
- Walther, K., Sartoris, F. J. & Pörtner, H. O. 2009. Impact of anthropogenic ocean acidification on thermal tolerance of the spider crab *Hyas araneus*. *Biogeosciences* **6**: 2207-2215.
- Watson III, W. H. & Wyse, G. A. 1978. Coordination of the heart and gill rhythms in *Limulus*. *Journal of Comparative Physiology* **124**: 267-275.
- Weeks, J. C. & Wood, E. R. 1996. Short- and long-term modification of reflex function during learning and metamorphosis in *Manduca*. *Biological Bulletin* **191**: 62-69.
- Whiteley, N. M., Robertson, R. F., Meagor, J., El Haj, A. J. & Taylor, E. W. 2001. Protein synthesis and specific dynamic action in crustaceans: effects of temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **128**: 595-606.

- Whiteley, N. M. & Taylor, E. W. 1993. The effects of seasonal variations in temperature on extracellular acid-base status in a wild population of the crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Journal of Experimental Biology* **181**: 295-311.
- Whiteley, N. M., Taylor, E. W. & el Haj, A. J. 1997. Seasonal and latitudinal adaptation to temperature in crustaceans. *Journal of Thermal Biology* **22**: 419-427.
- Wicks, S. R. & Rankin, C. H. 1996. The integration of antagonistic reflexes revealed by laser ablation of identified neurons determines habituation kinetics of the *Caenorhabditis elegans* tap withdrawal response. *Journal of Comparative Physiology A* **179**: 675-685.
- Wiersma, C. A. G. & Novitski, E. 1942. The mechanism of the nervous regulation of the crayfish heart. *Journal of Experimental Biology* **19**: 255-264.
- Wilkens, J. L. 1995. Regulation of the cardiovascular system in crayfish. *American Zoologist* **35**: 37-48.
- Wilkens, J. L. 1999. Evolution of the cardiovascular system in crustacea. *American Zoologist* **39**: 199-214.
- Wilkens, L. A. & Larimer, J. L. 1973. Sensory interneurons: some observations concerning the physiology and related structural significance of two cells in the crayfish brain. *Tissue & Cell* **5**: 393-400.
- Wine, J. J. 1984. The structural basis of innate behavioural pattern. *Journal of Experimental Biology* **112**: 283-319.
- Worden, M. K., Clark, C. M., Conaway, M. & Qadri, S. A. 2006. Temperature dependence of cardiac performance in the lobster *Homarus americanus*. *The Journal of Experimental Biology* **209**: 1024-1034.
- Wright, E. B. 1965. A comparative study on the effect of temperature on crustacean motor axons. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* **119**: 506-509.
- Yoshida, M., Hirano, R. & Shima, T. 2009. Photocardiography: a novel method for monitoring cardiac activity in fish. *Zoology Science* **26**: 356-361.
- Zahl, I. H., Kiessling, A., Samuelsen, O. B. & Olsen, R. E. 2010. Anesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiology and Biochemistry* **36**: 719-730.
- Zhurov, Y. & Brezina, V. 2005. Temperature compensation of neuromuscular modulation in *Aplysia*. *Journal of Neurophysiology* **94**: 3259-3277.

Verschiedenes

- Buduamoako, E., Toora, S., Walton, C., Ablett, R. F. & Smith, J. 1992. Thermal death times for listeria-monocytogenes in lobster meat. *Journal of Food Protection* **55**: 211-213.
- Calder, B. L., Bushway, A. A., Bayer, R. C., Davis-Dentici, K. A. & Camire, M. E. 2005. Quality of whole lobster (*Homarus americanus*) treated with sodium tripolyphosphate before cooking and frozen storage. *Journal of Food Science* **70**: C523-C528.
- Gabriel, S., Lau, R. W. & Gabriel, C. 1996. The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz. *Physics in Medicine and Biology* **41**: 2251-2269.
- Ibbott, S., Gardner, C. & Frusher, S. 2001. The effect of cooking on carapace length of southern rock lobster, *Jasus edwardsii* (Hutton, 1875) (Decapoda, Palinuridae). *Crustaceana* **74**: 221-224.
- Lawrence, J. F., Maher, M. & Watson-Wright, W. 1994. Effect of cooking on the concentration of toxins associated with paralytic shellfish poison in lobster hepatopancreas. *Toxicon* **32**: 57-64.
- Lee, G. H., Suriyaphan, O. & Cadwallader, K. R. 2001. Aroma components of cooked tail meat of American lobster (*Homarus americanus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 4324-4332.
- Leung, M. K. & Stefano, G. B. 1987. Comparative neurobiology of opioids in invertebrates with special attention to senescent alterations. *Progress in Neurobiology* **28**: 131-159.
- Patel, P. C. & Cockcroft, D. W. 1992. Occupational asthma caused by exposure to cooking lobster in the work environment: a case report. *Annals of Allergy* **68**: 360-361.
- Ramakrishnan, B. & Qasba, P. K. 2007. Role of a single amino acid in the evolution of glycans of invertebrates and vertebrates. *J Mol Biol* **365**: 570-576.
- Sanford, E. & Kelly, M. W. 2011. Local adaptation in marine invertebrates. *Annual Review of Marine Science* **3**: 509-535.
- Schmidtke, S. (2002) Die elektrische Leitfähigkeit als Diagnoseparameter für die Rindfleisch-Reifung. In: *Zentrum für Lebensmittelschaften*. pp. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- Sielaff, H. & Höft, K. H. 1979. Die elektrische Leitfähigkeit von Fleisch als objektive Stoffkenngröße für die Prozeßkontrolle. *Die Nahrung* **23**: 409-416.
- Skinner, F. K. & Mulloney, B. 1998. Intersegmental coordination in invertebrates and vertebrates. *Current Opinion in Neurobiology* **8**: 725-732.
- Smarandache, C. R., Daur, N., Hedrich, U. B. & Stein, W. 2008. Regulation of motor pattern frequency by reversals in proprioceptive feedback. *The European Journal of Neuroscience* **28**: 460-744.
- Smith, S. A., Scimeca, J. M. & Mainous, M. E. 2011. Culture and maintenance of selected invertebrates in the

- laboratory and classroom. *ILAR Journal* **52**: 153-164.
- Steneck, R. S., Wahle, R. A. & Sainte-Marie, B. 2013. American lobster dynamics in a brave new ocean. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **70**: 1612-1624.
- Taubert, E. (2001) Untersuchung der Zusammenhänge zwischen externen Belastungsfaktoren und der Fleischqualität von Puten. In: *Institut für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik der Landwirtschaftlichen Fakultät*. pp. Martin Luther Universität, Halle-Wittenberg.
- Turker, H. & Eversole, A. 1999. Evaluation of a nondestructive method for determining body composition of white river crayfish *Procambarus acutus*. *North American Journal of Aquaculture* **61**: 230-234.