



Fachgebiet für Umwelt- und Tierhygiene

Leitung: Prof. Dr. L. E. Hölzle

Abschlussbericht

„Desinfektion nach Ausbrüchen infektiöser Virusseuchen in Fischteichen“

Zuwendungsempfänger: Universität Hohenheim
Fachgebiet für Umwelt- und Tierhygiene
Garbenstrasse 30, 70599 Stuttgart
Tel.: 0711/45923569, Fax: 0711/45922431,
E-Mail: tierhygiene-460b@uni-hohenheim.de

Auftraggeber: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)

Förderkennzeichen: 2810HS006

Thema: Desinfektion nach Ausbrüchen infektiöser Virusseuchen in
Fischteichen“

Laufzeit: 01.10.2010-30.09.2013

Berichtszeitraum: 01.10.2010-30.09.2013

Zusammenarbeit mit anderen Stellen: Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und
Angewandte Ökologie (IME-AE), Auf dem
Aberg 1, 57392 Schmallenberg-Grafschaft
Gaiac, Forschungsinstitut für Ökosystemanalyse
und -bewertung e.V. an der RWTH Aachen
Kackertstr. 10, 52072 Aachen

Verfasst von:

Katja Kreisel (Hohenheim)

Dr. Silke Classen (Gaiac)

Prof. Dr. Christian Schlechtriem (Fraunhofer Institut IME)

Prof. Dr. Ludwig E. Hölzle (Hohenheim)

Dezember 2013

überarbeitet Juni 2014

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	3	
Abbildungsverzeichnis	5	
1	Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	6
1.1	Planung und Ablauf des Vorhabens	6
1.2	Wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde	9
2	Material und Methoden	12
2.1	Testviren	12
2.2	Zell-Linien	12
2.3	Zellkulturmedien	13
2.4	Zellkulturen	15
2.5	Herstellung von 96-Loch-Zellkulturplatten	15
2.6	Virusvermehrung	15
2.7	Bestimmung des Infektiositätstiters	16
2.8	Herstellung von Sandwichkeimträgern	17
2.9	Feststellung der pH-Sensitivität aller Testviren	18
2.10	Etablierung eines Nachweises der Testviren in verschiedenen Matrices (Wasser, Teichschlamm, Erde)	19
2.11	Prüfung der viruziden Wirkung von Desinfektionsmitteln	19
2.11.1	Desinfektionsmittel	19
2.11.2	Desinfektionsmittelprüfung	19
2.11.3	Zytotoxizitätstest	20
2.11.4	Interferenztest	20
2.11.5	Prüfung der viruziden Wirkung im Suspensionsversuch	21
2.11.6	Prüfung der viruziden Wirkung im Keimträgerstest	21
2.12	Feststellung der Resistenz der Viren gegen Trocknung	22
2.13	Feststellung der Resistenz der Viren gegenüber Wärmeinwirkung	22
2.14	Messung der Wirkung verschiedener Brannt- und Löschkalkbehandlungen auf Fischviren unter unterschiedlichen Bedingungen (Laborteich-Versuche)	23
2.15	Feldversuche	24
2.16	Literaturstudie zur Ökotoxikologie von Desinfektionsverfahren	25
2.17	Ökotoxikologische Tests	25
2.18	Ökologisches Monitoring von Desinfektionsverfahren in Teichanlagen	27
3	Ergebnisse	30
3.1	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	30

3.1.1	Herstellung hochtitriger Virussuspensionen	30
3.1.2	Herstellung von Sandwichkeimträgern mit hohen Virustitern	30
3.1.3	Feststellung der pH-Sensitivität von VHSV, HVAV und KHV	31
3.1.4	Untersuchung der Tenazität der Testviren in unterschiedlichen Teichmatrices (Wasser, Schlamm)	39
3.1.5	Durchführung der Desinfektionsmittelprüfungen mit den Testviren	43
3.1.5.1	Zytotoxizitätstests	44
3.1.5.2	Interferenztests	45
3.1.5.3	Suspensionstests	46
3.1.5.4	Keimträgertests	49
3.1.6	Feststellung der Resistenz der Viren gegen Trocknung	54
3.1.7	Feststellung der Resistenz der Viren gegenüber Wärmeeinwirkung	58
3.1.8	Untersuchungen zur Inaktivierung verschiedener Fischviren mittels verschiedener Kalkformulierungen in Laborteichen	64
3.1.9	Feldversuche	71
3.1.10	Rohdaten der Laborversuche	75
3.1.11	Literaturstudie zur Ökotoxikologie von Desinfektionsverfahren	75
3.1.12	Ökotoxikologische Tests im Laborversuch	76
3.1.13	Ökologisches Monitoring in Teichanlagen	81
3.2	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	85
4	Zusammenfassung	103
5	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen	105
6	Literaturverzeichnis	110
7	Anhänge	111

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Verwendete Virusstämme und Virusisolate
- Tabelle 2: Verwendete Zell-Linien
- Tabelle 3: Zellkulturmedien für die Kultivierung der verschiedenen Zell-Linien
- Tabelle 4: Übersicht über die für die Vermehrung der verschiedenen Fischviren verwendeten Zell-Linien
- Tabelle 5: Schema für die Herstellung der Sandwichkeimträger
- Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Einwirkzeiten bei verschiedenen Temperaturen
- Tabelle 7: Titerwerte der hergestellten Virussuspensionen der untersuchten Fischviren
- Tabelle 8: Titerstufen der Sandwichkeimträger und deren Ausgangsvirussuspensionen
- Tabelle 9: pH-Sensitivität von VHS-Virus 1087 im Suspensionstest (HCl, NaOH)
- Tabelle 10: pH-Sensitivität von VHS-Virus 1087 im Suspensionstest (Ca(OH)₂)
- Tabelle 11: pH-Sensitivität von VHS-Virus 1087 im Sandwichkeimträgertest (NaOH)
- Tabelle 12: pH-Sensitivität von VHS-Virus 1087 im Sandwichkeimträgertest (Ca(OH)₂)
- Tabelle 13: pH-Sensitivität von HVAV 110 im Suspensionstest (HCl, NaOH)
- Tabelle 14: pH-Sensitivität von HVAV 110 im Suspensionstest (Ca(OH)₂)
- Tabelle 15: pH-Sensitivität von HVAV 110 im Sandwichkeimträgertest (NaOH)
- Tabelle 16: pH-Sensitivität von HVAV 110 im Sandwichkeimträgertest (Ca(OH)₂)
- Tabelle 17: pH-Sensitivität von KHV-T im Suspensionstest (NaOH)
- Tabelle 18: pH-Sensitivität von KHV-T im Suspensionstest (Ca(OH)₂)
- Tabelle 19: pH-Sensitivität von KHV-T im Sandwichkeimträgertest (NaOH)
- Tabelle 20: pH-Sensitivität von KHV-T im Sandwichkeimträgertest (Ca(OH)₂)
- Tabelle 21: Ergebnisse der Zytotoxizitätstests für die Zell-Linien EK-1, CCB und RTG 2/f
- Tabelle 22: Ergebnisse des Interferenztests der Viren VHS 1087, HVA 110 und KHV-T
- Tabelle 23: Desinfektionsmittelprüfung, VHS-Virus 1087 im Suspensionstest
- Tabelle 24: Desinfektionsmittelprüfung, KHV-T im Suspensionstest
- Tabelle 25: Desinfektionsmittelprüfung, HVAV 110 im Suspensionstest (DVG-Vorgaben)
- Tabelle 26: Desinfektionsmittelprüfung, HVAV 110 im Suspensionstest
- Tabelle 27: Hauptprüfung von VHSV 1087 im Sandwichkeimträgertest
- Tabelle 28: Desinfektionsmittelprüfung, VHSV 1087 im Keimträgertest
- Tabelle 29: Hauptprüfung von KHV-T im Sandwichkeimträgertest
- Tabelle 30: Desinfektionsmittelprüfung, KHV-T im Keimträgertest
- Tabelle 31: Hauptprüfung von HVAV 110 im Sandwichkeimträgertest
- Tabelle 32: Desinfektionsmittelprüfung, KHV-T im Keimträgertest

- Tabelle 33: Ergebnisse der Trocknungsresistenz auf verschiedenen Keimträgern
- Tabelle 34: D90-Werte (in Tagen) des KH-Virus T in Laborteichen unter Verwendung von verschiedenen Sedimenten und Kalkformulierungen
- Tabelle 35: D90-Werte (in Tagen) des VHS-Virus 1087 in Laborteichen unter Verwendung von verschiedenen Sedimenten und Kalkformulierungen
- Tabelle 36: D90-Werte (in Tagen) des HVA-Virus 110 in Laborteichen unter Verwendung von verschiedenen Sedimenten und Kalkformulierungen
- Tabelle 37: NOEC, LOEC und EC50 des ökotoxikologischen Tests mit *Habrophlebia lauta*
- Tabelle 38: NOEC, LOEC und EC50 der ökotoxikologischen Tests mit *Gammarus*
- Tabelle 39: Ökologische Zustandsklassen der Module Saprobie und Allgemeine Degradation der Probenahme vor und nach Ablassen der Versuchsteiche
- Tabelle 40: Veränderung der Lebensgemeinschaften durch die Einleitung von Kalkwasser
- Tabelle 41: Übersicht über die Wirkung der untersuchten Desinfektionsmittel und -methoden unter Berücksichtigung der verwendeten Testsysteme und -bedingungen

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Laborteich mit eingebrachten Sandwichkeimträgern
- Abbildung 2: Persistenz von HVAV 110 und KHV-T im Aquakultur-Oberflächenwasser (Landkreis Calw) bei 4 °C, 10 °C und 20 °C
- Abbildung 3: Persistenz von HVAV 110 und KHV-T im Eiszeiteichwasser bei 4 °C, 10 °C und 20 °C
- Abbildung 4: Persistenz von HVAV 110 im Aquakultur-Teichschlamm bei 10 °C und 20 °C
- Abbildung 5: Resistenz von HVAV 110, KHV-T, VHSV 1087 gegenüber Trocknung auf Metallkeimträgern bei Raumtemperatur
- Abbildung 6: Resistenz von HVAV 110, KHV-T, VHSV 1087 gegenüber Trocknung auf Holzkeimträgern bei Raumtemperatur
- Abbildung 7: Resistenz von HVAV 110, KHV-T, VHSV 1087 gegenüber Trocknung auf einem Filter (Virosorb) bei Raumtemperatur
- Abbildung 8: Persistenz der Viren bei 25 °C
- Abbildung 9: Inaktivierungskinetik der Viren bei 40 °C
- Abbildung 10: Persistenz der Viren bei 40 °C
- Abbildung 11: Inaktivierungskinetik der Viren bei 55 °C
- Abbildung 12: Persistenz der Viren bei 55 °C
- Abbildung 13: Inaktivierungskinetik der Viren bei 70 °C
- Abbildung 14: Persistenz der Viren bei 70 °C
- Abbildung 15: Persistenz von KHV-T unter Laborbedingungen bei pH 11 und pH 12 (4 °C) mit Oberflächenwasser/Sediment aus einer Aquakulturanlage und dem Hohenheimer Eiszeiteich
- Abbildung 16: Persistenz von VHSV 1087 unter Laborbedingungen bei pH 11 und pH 12 (4 °C) mit Oberflächenwasser/Sediment aus einer Aquakulturanlage, dem Hohenheimer Eiszeiteich und einem Standardsediment
- Abbildung 17: Persistenz von HVAV 110 unter Laborbedingungen bei pH 11 und pH 12 (4 °C) mit Oberflächenwasser/Sediment aus dem Hohenheimer Eiszeiteich
- Abbildung 18: Feldversuch 1: Persistenz von FV 58/2-Virus (VHSV) in Fischteichen
- Abbildung 19: Feldversuch 2: Persistenz von FV 22/1-Virus (VHSV) in Fischteichen
- Abbildung 20: Feldversuch 2: Persistenz von FV 22/1-Virus (VHSV) in Bodenproben
- Abbildung 21: Feldversuch 3: Persistenz von Vi 1451-Virus (VHSV) in Fischteichen
- Abbildung 22: %-Anteil überlebender (links) und mobiler (rechts) *Habrophlebia lauta* in den Testansätzen mit CaO
- Abbildung 23: %-Anteil überlebender (links) und mobiler (rechts) *Habrophlebia lauta* in den Testansätzen mit Halamid
- Abbildung 24: %-Anteil überlebender *Gammarus pulex* in den Testansätzen mit CaO
- Abbildung 25: %-Anteil überlebender *Gammarus pulex* in den Testansätzen mit Halamid

1 Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Gesamtziel des Vorhabens

Die Ziele des Vorhabens bestanden darin, die Desinfektion von naturnahen Fischteichen zu validieren und Empfehlungen für Desinfektionsmaßnahmen für spezifische Vor-Ort-Situationen zu entwickeln. Die Umweltverträglichkeit verschiedener Maßnahmen sollte beurteilt werden.

Die Wirksamkeit verschiedener Desinfektionsmittel und -verfahren auf Erreger von Fischseuchen (VHS, IHN, KHV, IPN) sollte unter Laborbedingungen und unter Produktionsbedingungen von Aquakulturanlagen mit Naturböden und -wänden untersucht werden. Die Versuche in Aquakulturanlagen wurden durch eine Untersuchung der Auswirkungen der Maßnahmen auf die biologische Umwelt begleitet, um auch Aussagen über die Umweltverträglichkeit der Maßnahmen treffen zu können.

Wissenschaftliche und/oder technische Arbeitsziele des Vorhabens:

- Verbesserung des Verständnisses der Wirksamkeit verschiedener Desinfektionsmittel unter verschiedenen Bedingungen
- Optimierung der Desinfektion von naturnahen Teichanlagen nach Ausbruch viraler Seuchen
- Entwicklung von Standardmethoden für die Desinfektion solcher Anlagen auch unter dem Aspekt der Umweltverträglichkeit.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Zur Erarbeitung von aussagekräftigen und validen Daten zur Ableitung von Empfehlungen für Desinfektionsverfahren im Rahmen von Ausbrüchen von anzeigepflichtigen Fischseuchen wurde ein mehrstufiges Untersuchungsschema durchgeführt.

Zunächst wurden für die verursachenden Viren der viralen hämorrhagischen Septikämie der Salmoniden (VHS), der Infektiösen hämatopoetischen Nekrose der Salmoniden (IHN) und der Koi-Herpesvirus-Infektion (KHV) der Karpfen Virusvermehrungen in den jeweils permissiven Zell-Linien durchgeführt, um für alle Testviren die für die weitergehenden Analysen notwendigen hochtitrigen Virussuspensionen zur Verfügung zu haben. Zusätzlich wurde als sog. Surrogatvirus für das Koi-Herpesvirus noch das Herpesvirus anguillae (HVAV) in die Untersuchungen des Projektes integriert. Dieses Virus besitzt ähnliche biologische und morphologische Eigenschaften wie das KHV, ist aber in der Handhabung im Labor (Vermehrung, Höhe des Virustiters) unproblematischer als das KHV. Das IPN-Virus,

ein Vertreter der Birnaviridae, das die sog. infektiöse Pankreasnekrose der Salmoniden verursacht, war zu Beginn des Projektvorhabens noch Bestandteil des Arbeitsplanes wurde aber mit dem Änderungsbescheid vom 06.09.2012 aufgrund der Tatsache, dass dieses Virus nicht tierseuchenrechtlich berücksichtigt wird, aus dem Arbeitsprogramm gestrichen.

Die Überprüfung des Erfolgs von Inaktivierungsmaßnahmen gegen die verschiedenen Viren steht und fällt mit dem Erreichen eines möglichst hohen Ausgangstiters des zu inaktivierenden Virusmaterials. Ein Desinfektionserfolg gilt in den gängigen Vorschriften zur Testung von Desinfektionsmitteln und -verfahren als erreicht, wenn der Titer des Ausgangsvirusmaterials um mindestens 4 \log_{10} -Stufen reduziert wird. Deshalb ist für eine valide Beurteilung dieser Reduktionsrate ein Virus-Ausgangstiter von $\geq 10^5$ - 10^6 nötig.

Im nächsten Schritt wurden für die sog. Hauptprüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln im Keimträgerstest und für die Überprüfung der Desinfektion der Testviren in Laborteichen sowie in Freilandversuchen von allen zu untersuchenden Referenzviren und von Ausbruchs-Virusisolaten sog. Sandwichkeimträger hergestellt.

Nach Abschluss dieser Vorarbeiten konnte mit den eigentlichen Hauptversuchen begonnen werden.

Als erstes wurden die Testviren auf ihre Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen pH-Werten getestet. Dazu wurden die Virusmaterialien in Suspensionstests verschiedenen pH-Werten ausgesetzt. Die pH-Werte 3 und 5 wurden dabei mit Salzsäure eingestellt, die alkalischen pH-Werte 10-12 wurden zum einen mit Natronlauge und zum anderen mit Löschkalk ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) eingestellt. Dadurch sollte untersucht werden, ob die Wirkung auf die Viren nur über den pH verursacht war oder im Falle von Löschkalk noch andere Wirkungseffekte auftraten. Um die pH-Sensitivität von an Oberflächen gebundenen Viren zu analysieren wurden die pH-Werte 10-12 (NaOH, Löschkalk) auch mit Virusmaterial auf Sandwichkeimträgern untersucht. In Analogie zur Desinfektionsmitteltestung war so eine belastbare Aussage bezüglich der pH-Sensitivität der einzelnen Testviren möglich.

Im nächsten Schritt wurden insgesamt sechs verschiedene Desinfektionsmittel auf ihre viruzide Wirkung gegenüber den Fischviren getestet. Als Desinfektionsmittel wurden Wirkstoffe ausgewählt, die zum einen in der Fischzucht für verschiedene Anwendungsgebiete (Teiche, Geräte, Eier etc.) gebraucht werden, zum anderen aber auch die wichtigsten Wirkstoffgruppen von gebräuchlichen Desinfektionsmitteln repräsentieren i.e. Ameisensäure

als Vertreter der organischen Säuren, Didecyldimethylammoniumchlorid als Vertreter der quaternären Ammoniumverbindungen, Formalin als Vertreter der Aldehyde, Kalkmilch, Povidon-Iod als Vertreter der Iodophore und Peressigsäure als Vertreter der Peroxide. Die viruzide Wirkung der Desinfektionsmittel wurde entsprechend der Prüfrichtlinien des Desinfektionsmittelausschusses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft durchgeführt.

Anschließend wurden die Testviren auf ihre Resistenz gegenüber Trocknung und Einwirkung verschiedener Temperaturen (25 °C, 40 °C, 55 °C, 70 °C) getestet. Trocknung und Einwirkung von Wärme können gute Alternativen zu chemischen Verfahren zur Desinfektion von Fischviren in naturnahen Teichanlagen darstellen. Dazu fehlten aber bisher belastbare Labordaten.

Das Gleiche gilt für die Stabilität der ausgewählten Fischviren in den verschiedenen Matrices einer Teichanlage (Wasser, Schlamm). Deshalb wurden im Verlauf des Projektes Laborversuche zur Tenazität von VHSV, HVAV und KHV durchgeführt. Dazu wurden die Viren mittels Sandwichkeimträgern im Labor in Wasser und Teichschlamm eingebracht und über einen Zeitraum von 42 d und einer Temperatur von 4 °C gelagert. Über die Zeitperiode wurden fortlaufend Proben entnommen und die Titer des Restvirusmaterials bestimmt. Auf Basis dieser Daten konnten sog. D90-Werte berechnet werden. Der D90-Wert beschreibt die Zeitspanne, die nötig ist, um den Titer des Virusmaterials um eine \log_{10} -Stufe zu reduzieren. Durch die Bestimmung der D90-Werte ist eine Aussage über die Persistenz der Viren unter den gegebenen Umweltbedingungen möglich.

Ein wichtiger Teil des Projektes beschäftigte sich mit der Wirkung einer Kalkung (Branntkalk versus Löschkalk) auf die Fischviren. Branntkalk ist entsprechend der Desinfektionsrichtlinie des BMELV Mittel der Wahl für die Desinfektion von Fischteichen beim Ausbruch von anzeigepflichtigen Fischseuchen. Der Hauptteil der Untersuchungen dazu wurde in sog. Laborteichen durchgeführt. Für die Laborteiche wurden Oberflächenwasser und Teichschlamm aus zwei unterschiedlichen naturnahen Teichen sowie ein künstliches Sediment verwendet. Es wurden die Sandwichkeimträgermethode mit den entsprechenden Testviren in einer Sedimenttiefe von 3 cm, an der Sedimentoberfläche und im Wasser ausgebracht und über 5 Tage bei unterschiedlichen Temperaturen (4 °C, 10 °C, 20 °C) mittels Brannt- bzw. Löschkalk behandelt.

Die Analysen in den Laborteichen wurden durch Freilandversuche im Rahmen von Ausbrüchen von anzeigepflichtigen Fischseuchen in verschiedenen Aquakulturanlagen in Baden-Württemberg ergänzt.

Desinfektionsverfahren mit chemischen Substanzen bergen ein Risiko für die Mikroflora und Mikrofauna in naturnahen Teichanlagen. Aus diesem Grund wurden in diesem Projekt Studien zur Ökotoxikologie durchgeführt, um dadurch eine Gefährdungsbeurteilung für die jeweiligen Desinfektionsmaßnahmen ableiten zu können.

Zur Beurteilung der ökologischen Auswirkung von Desinfektionsmaßnahmen auf die Lebensgemeinschaft der Wirbellosen in dem Gewässer unterhalb des behandelten Fischteichs sollten im Rahmen von 10 Fallstudien die Makroinvertebratengemeinschaften im Ober- und Unterlauf der Fischteichzuchtanlage vor und nach der Behandlung eines Teiches mit Löschkalk untersucht werden. Mögliche Auswirkungen auf die Abundanz einzelner Populationen und die Artzusammensetzung der Lebensgemeinschaft können so festgestellt werden. Begleitend wurden die physiko-chemischen Wasserparameter wie Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Leitfähigkeit im Versuchsverlauf erfasst. Für eine potentiell notwendige Analyse der Nährstoffverhältnisse wurden außerdem noch Wasserproben genommen.

Diese Studien wurden durch eine umfangreiche Literaturstudie und durch Labortests zur Ökotoxikologie von Desinfektionsmitteln, i.e. Kalk, Halamid ergänzt.

1.2 Wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde

In Deutschland kommen bei Fischen einige virale Infektionen vor, die als sog. Fischseuchen anzeigepflichtig sind, i.e. die Virale Hämorrhagische Septikämie der Salmoniden (VHS), die Infektiöse Hämato-poetische Nekrose der Salmoniden (IHN) und die Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV). Sie treten jedes Jahr in mehreren Teichwirtschaften in Deutschland auf. So wurden zwischen 2005 und 2009 jährlich 4 bis 12 Fälle IHN, 28 bis 36 Fälle VHS und 49 bis 231 Fälle KHV diagnostiziert (Tierseuchennachrichtensystem, 03.12.2009). Daneben tritt auch die infektiöse Pankreasnekrose (IPN), eine zum Zeitpunkt des Projektbeginns noch meldepflichtige Tierseuche, auf. Das die IPN verursachende Virus (IPNV) war u.a. aufgrund seiner in der Literatur beschriebenen hohen Tenazität zu Projektbeginn noch Gegenstand der geplanten Arbeiten. Es wurde aber aufgrund der Aufhebung der Meldepflicht für die IPN im Verlauf der Durchführung dieses Projektes (Änderungsbescheid vom 06.09.2012) in den Arbeiten nicht mehr berücksichtigt.

Die Desinfektion ist eine wichtige Hygienemaßnahme in der Aquakultur und sollte routinemäßig durchgeführt werden. Sie muss aber auch gezielt nach Ausbrüchen infektiöser Krankheiten zum Einsatz kommen, um die Fischzucht, die gehaltenen Fische und die Umwelt vor Krankheiten und Schäden zu schützen. Naturnahe Teichanlagen mit Naturböden und eventuell auch -wänden sind besonders schwierig zu desinfizieren, weil viele handelsübliche Desinfektionsmittel sich schon an der organischen Substanz der Böden und Wände verbrauchen. Für die Desinfektion von Teichanlagen stehen sehr wenige chemische Substanzen zur Verfügung, von denen keine für den Einsatz gegen Fischseuchen validiert wurde.

Frühere Untersuchungen mit verschiedenen fischpathogenen Viren, inklusive VHSV und IPNV, zeigten, dass diese gegenüber chemisch physikalischen Einflüssen relativ stabil sind. Insbesondere IPNV zeigte sich resistent gegen verschiedene Behandlungen. Einfluss auf die Tenazität hatten die Inkubationstemperatur, der Proteingehalt des Wassers und der Matrix, in der die Viren eingebettet wurden (Wasser oder Teichschlamm; Ahne, 1982). Zur Tenazität von KHV sowie zur Wirkung von Desinfektionsmitteln unter Feldbedingungen und unter feld-ähnlichen Bedingungen im Labor gab es noch keine publizierten Untersuchungen.

Die am häufigsten für die Desinfektion naturnaher Teichanlagen eingesetzte Substanz ist Branntkalk (CaO) (ca. $0,5 \text{ kg/m}^2$) (OIE, 2009; Bund-Länder Task Force Tierseuchenbekämpfung, 2007). Branntkalk hat verschiedene Wirkungsweisen, die zu einer Reduktion der Viruslast in behandelten Teichen führen können. Beim Einsatz in trockengelegten Teichen kommt es zunächst zu einer weiteren Austrocknung des Teichbodens (OIE, 2009). Beim Löschprozess von Branntkalk und Wasser entsteht zuerst Hydratkalk bzw. Löschkalk $\text{Ca}^{2+} + 2\text{OH}^-$, durch weiteren Entzug von H^+ -Ionen aus dem Hydrogencarbonat $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Dieser Vorgang bewirkt eine Erhöhung des pH-Wertes. Im weiteren Verlauf des Löschvorganges wird der pH-Wert weiter gesteigert. Zum Schluss des Löschvorganges hat man Wasser und Calciumcarbonat (CaCO_3), das ausfällt. Immer wenn H^+ -Ionen verbraucht werden steigt der pH-Wert. Nach Kontakt mit Wasser kommt es auch zu einer exothermen Reaktion, die zu einer Keimreduktion beitragen könnte. Die Effektivität dieser Wirkmechanismen bei der Desinfektion von Teichanlagen ist eine rein empirische Erkenntnis und noch nicht ausreichend erforscht und validiert. Die Austrocknung von Teichen gelingt i. d. R. nie vollständig, da der Wasserdurchlauf nicht in allen Fällen komplett eingestellt werden kann. Mit der Entwicklung einer exothermen Reaktion ist bei größeren Teichen an der freien Luft nicht zu rechnen, da die entstehende Hitze sich sehr schnell verflüchtigt. Die pH-Wertverschiebung ist messbar und kann durch Nachkalkung auch reguliert werden. Allerdings ist

der Effekt dieser pH-Wert-Verschiebung auf einige fischpathogene Viren, besonders unter Feldbedingungen, nicht ausreichend bekannt. Weitere in der Teichwirtschaft gängige Desinfektionsmittel sind pH12-Kalkmilch (zur Desinfektion von Rohrleitungen und Wegen) und Formalin (zur Desinfektion von Holzteilen und Rohrleitungen). Peressigsäure (z.B. Wofasteril), quarternäre Ammoniumverbindungen (z.B. Divosan SD), Iodophore (Aktomar B100), organische Säuren (VennoVet 1 super) und Peroxidverbindungen (z.B. Virkon S) werden ebenfalls eingesetzt, aber vorwiegend zur Desinfektion von Behältnissen und Gerätschaften.

In einem Vorversuch wurde bereits ein Feldversuch zur Desinfektion von Naturteichen mit ECBO Virus (ein Picornavirus) und IHNV von der Universität Hohenheim und den Kooperationspartnern in Baden-Württemberg durchgeführt. Dieser Versuch zeigte, dass die Desinfektion mit Brannt- und Löschkalk beim Einsatz ausreichender Kalkmengen u. U. gleichwertig sein kann. Vorversuche zur Keimträgertechnik mit dem Fischvirus IHNV ergaben, dass die an der Universität Hohenheim entwickelte Sandwichkeimträgermethode für dieses Virus eingesetzt werden kann.

Zur Umweltverträglichkeit der entsprechenden Maßnahmen und Mittel insbesondere auf die aquatische Lebensgemeinschaft unterhalb der Fischteiche, lagen kaum Informationen vor.

2 Material und Methoden

2.1 Testviren

Für die Untersuchungen zur Wirksamkeit verschiedener Desinfektionsmittel und –verfahren auf Erreger von Fischseuchen wurden insgesamt 7 Viren (4 Referenzvirus-Stämme, 3 Feldvirus-Isolate) ausgewählt. Die Viren, ihre Bezeichnung, Herkunft und die Bezugsquellen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Verwendete Virusstämme und Virusisolate

Viren	Herkunftshinweise	Bezugsquelle
Referenzviren		
Herpesvirus <i>anguillae</i> (HVAV 110)	O. L. M. Haenen, CIDC Lelystad	Friedrich-Loeffler-Institut, (FLI), Insel Riems
Koi-Herpesvirus (KHV-T)	Dr. Pei-Yu Lee , University of Taipei, Taiwan	FLI, Insel Riems
Virale Hämorrhagische Septikämie- (VHS-) Virus (VHSV 1087)	Enzmann FLI Tübingen	FLI, Insel Riems
Infektiöse Hämato-poetische Nekrose- (IHN-) Virus IHN 250	Enzmann FLI Tübingen	FLI, Insel Riems
Feldisolate		
VHSV FV 58/2	Teichanlage Landkreis Schwäbisch Hall	Stammsammlung, Fachgebiet für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim
VHSV FV 22/1	Teichanlage Landkreis Karlsruhe	Stammsammlung, Fachgebiet für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim
VHSV Vi 1451	Teichanlage Landkreis Ortenaukreis	Stammsammlung, Fachgebiet für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim

2.2 Zell-Linien

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 4 permanente Zellkultur-Linien verwendet, die aufgrund ihrer Empfänglichkeit für die verschiedenen Viren ausgewählt wurden. Die Bezeichnung, Herkunft, die Bezugsquellen sowie die Empfänglichkeit für die unterschiedlichen Viren sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Verwendete Zell-Linien

Zelllinie	Herkunft	Bezugsquelle
EK-1 Japanese Eel (<i>Anguilla japonica</i>) kidney	Dr. M. Yoshimizu, Hokkaido University, Japan	FLI, Insel Riems Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin (CCVM)- RIE 809
CCB Common Carp Brain	Dr. M. Neukirch, Tierärztliche Hochschule Hannover	FLI, Insel Riems CCVM-RIE 816
RTG-2/f Rainbow Trout, gonad tissue	Dr. J.M. Dijkstra, Fujita-Health-University, Nagoya, Japan	FLI, Insel Riems CCVM-RIE 686
EPC <i>Pimephales promelas</i>	Danish Vet. Lab./EU Reference Lab. for Fish Diseases, Dänemark	FLI, Insel Riems CCVM-RIE 173

2.3 Zellkulturmedien

Ham's F-12 Medium (Biochrom AG, Berlin, Deutschland).

Basal Iscove's Medium (Biochrom AG)

MEM-Earle's Medium (Biochrom AG)

L-15 Leibovitz Medium (Biochrom AG)

Die für die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien verwendeten Medien sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Zellkulturmedien für die Kultivierung der verschiedenen Zell-Linien

Zelllinie	Medium	Supplemente
EK-1	Ham's F-12 + Basal Iscove's (1:1)	10 % fötales Kälberserum (FKS) im Vermehrungsmedium 2 % FKS im Erhaltungsmedium 60 mg/ml Penicillin 256 mg/ml Streptomycin 5 mg/ml Gentamycin 250 µg/ml Amphotericin
EK-1	L-15 Leibovitz	10 % FKS im Vermehrungsmedium 2 % FKS im Erhaltungsmedium 60 mg/ml Penicillin 256 mg/ml Streptomycin 5 mg/ml Gentamycin 250 µg/ml Amphotericin
CCB	MEM-Earle's	25 mM HEPES 10 % FKS im Vermehrungsmedium 2 % FKS im Erhaltungsmedium 60 mg/ml Penicillin 256 mg/ml Streptomycin 5 mg/ml Gentamycin 250 µg/ml Amphotericin
RTG-2/f	Ham's F-12 + Basal Iscove's (1:1)	10 % FKS im Vermehrungsmedium 2 % FKS im Erhaltungsmedium 60 mg/ml Penicillin 256 mg/ml Streptomycin 5 mg/ml Gentamycin 250 µg/ml Amphotericin
EPC	MEM-Earle's + MEM Hanks'	NaHCO ₃ (1,25 g/l) NaPyruvat (0,012 g/l) Nicht essentielle Aminosäuren (1x) 10 % FKS im Vermehrungsmedium 2 % FKS im Erhaltungsmedium 60 mg/ml Penicillin 256 mg/ml Streptomycin 5 mg/ml Gentamycin 250 µg/ml Amphotericin

2.4 Zellkulturen

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm² und 175 cm²) regelmäßig im Abstand von 2-5 Tagen passagiert. Nach dem Dekantieren des Mediums wurde der konfluente Zellrasen mit 5 ml Trypsin-Versen-Lösung (136 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 6 mM Na₂HPO₄, 0,9 mM CaCl₂, 0,05% Trypsin-Trockensubstanz, 3 mM Versen, pH 7,0) gewaschen und anschließend der Zellrasen durch das Einwirken (5 min, RT) von Trypsin-Versen-Lösung abgelöst. Nach Zugabe von Zellkulturmedium wurden die Zellen resuspendiert und wieder ausgesät. Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte bei den in Tabelle 4 angegebenen Temperaturen.

2.5 Herstellung von 96-Loch-Zellkulturplatten

Die Bestimmung des Virus-Infektiositätstiters erfolgte auf 96-Loch-Zellkulturplatten (Mikrotiterplatten). Dazu wurde die Zellzahl auf 2×10^4 Zellen/100 µl eingestellt und 100 µl der Zell-Medium-Mischung in jede Vertiefung pipettiert. Die Inkubation der Zellkulturplatten erfolgte im Inkubator bei den in Tabelle 4 angegebenen Temperaturen.

2.6 Virusvermehrung

Für die Virusvermehrung wurden einen Tag alte, ca. 75% konfluente Zellkulturen verwendet. Das Wachstumsmedium wurde aus den Zellkulturflaschen entfernt. Anschließend wurde 1,5 ml (bei 75 cm²-Flaschen) bzw. 3 ml (bei 175 m²-Flaschen) Virussuspension auf den Zellrasen gegeben und zur Adsorption der Viren an die Zellen 1 h bei 25 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden in die 75 cm² Zellkulturflaschen 20 ml und auf die 175 cm² Zellkulturflaschen 40 ml Erhaltungsmedium pipettiert. Als Zellkontrolle wurde eine Zellkulturflasche anstelle mit Virussuspension eine Stunde mit Medium inkubiert und mit dem Erhaltungsmedium befüllt. Die Zellkulturflaschen wurden bei den in Tabelle 4 angegebenen Temperaturen inkubiert und täglich mikroskopisch auf das Vorhandensein eines zytopathischen Effekts (CPE) in Form von morphologischen Zellveränderungen, Abkugelungen, Synzytienbildung und Zellablösungen untersucht.

Sobald mehr als 70 % des Zellrasens einen CPE aufwiesen, wurden die Flaschen bei -80 °C eingefroren und anschließend wieder aufgetaut. Durch den Gefrier-Auftau-Prozess wurden die Zellen zerstört und Virus freigesetzt. Nach dem Auftauen wurde die Zell-Virusmischung zentrifugiert (500 x g, 15 min, 4 °C), wodurch die Zelltrümmer aus der Suspension entfernt wurden. Aliquots (10 ml) der Virussuspension wurden bei -80 °C gelagert. Für die Bestimmung der Infektiosität wurde die „Multiplicity of Infection“ (MOI) für jede

Virusvermehrung bestimmt. Die MOI wurde wie folgt berechnet: (ml des Inokulums x Titer des Inokulums) / (Zellzahl) = MOI KID₅₀/Zelle (KID: kulturinfektiöse Dosis).

Tabelle 4: Übersicht über die für die Vermehrung der verschiedenen Fischviren verwendeten Zell-Linien

Virus	Zelllinie	Kultivierungstemperatur
HVAV	EK-1	25 °C
KHV-T	CCB	25 °C
VHSV	RTG-2/f	15 °C
IHNV	EPC	15 °C

2.7 Bestimmung des Infektiositätstiters

Die Infektiosität der verschiedenen Virus-Vermehrungen (kulturinfektiöse Dosen, KID₅₀/ml) wurden nach der sog. logarithmischen Endpunkt-Verdünnungsmethode (Spearman 1908; Kärber 1931; Reed et al. 1938) bestimmt.

Dazu wurde die jeweilige Zelllinie 24 h vor der Virustitration auf 96-Lochplatten inokuliert. Von der Virussuspension wurde mit dem für die jeweilige Zelllinie benötigten Zellkulturmedium eine dekadische Verdünnungsreihe (10⁻¹–10⁻⁸) hergestellt. Die Verdünnungsreihe wurde auf die vorbereiteten 96-Lochplatten aufgetragen, in dem pro Verdünnungsstufe jeweils 100 µl in 4 Vertiefungen pipettiert wurden. Zusätzlich wurde eine Zellkontrolle mit dem Zellmedium aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei der entsprechenden Virusvermehrungstemperatur. Die 96-Lochplatten wurden täglich lichtmikroskopisch auf CPE untersucht, das Ergebnis entsprechend dokumentiert und so der Infektiositätstiter KID₅₀/ml entsprechend der Endpunkt-Verdünnungsmethode kalkuliert. Der KID₅₀ beschreibt die „50 %-Infektionsdosis der Virussuspension oder der Verdünnung der Virussuspension, die in 50 % der Zellkultureinheiten einen CPE auslöst“ (CEN 2006). Dafür müssen mehrere Verdünnungen verwendet werden, die den Bereich der Infektion aller Zellkultureinheiten bis zu denen, innerhalb derer es keine Virusvermehrung mehr gibt, abdecken (CEN 2006). Die Berechnungen des log₁₀ KID₅₀/ml wurden mit folgender Formel durchgeführt:

$$\text{Log}_{10}\text{KID}_{50}=(X_0 -d/2+d(\sum r)/n$$

Berücksichtigt wurden die CPE-positiven Vertiefungen ab der höchsten Verdünnungsstufe, in der alle Ansätze positiv waren.

- X_0 : dekadischer Logarithmus der höchsten Verdünnung, in der noch bei allen Vertiefungen ein CPE sichtbar war.
- d: log-Stufe des Verdünnungsfaktors
- r: Anzahl der positiven Vertiefungen pro Stufe
- n: Anzahl der Ansätze pro Stufe

2.8 Herstellung von Sandwichkeimträgern

Für die Bestimmung der Tenazität wurden von Traub et al. (1986) beschriebene und nach Nazir et al. (2010) modifizierte Sandwichkeimträger verwendet und für jede Virus-Spezies angepasst (Strang, 2011). Eine einheitliche, für alle Virus-Spezies gleichermaßen anwendbare Methode für die Herstellung von Keimträgern mit hohen Virustitern konnte nicht etabliert werden.

Es wurde ein Sandwichkeimträger verwendet, der aus einem elektropositiv geladenen Zeta plus Virosorb 1 MDS Filter (\varnothing 15 mm) und einer Polycarbonmembran (PCM) mit 10 nm Porengröße bestand. Die PCM verhindert aufgrund ihrer geringen Porengröße den Austritt von Viruspartikeln und gewährleistet gleichzeitig den Durchlass von chemischen Stoffen. Als Beladungspuffer wurde ein Phosphat-Beladungspuffer bestehend aus 88,9 Teilen KH_2PO_4 (9,073g/l auf A. bidest.) und 11,1 Teilen $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (11,87 g/l auf A. bidest.) verwendet, der auf den für das Virus spezifischen pH-Wert mit 1 M HCL bzw. 1 M NaOH eingestellt wurde (Tabelle 5). Die Zeta plus Virosorb 1 MDS Filter wurde mittels sterilen Spritzenaufsatz-Filter-Halter (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany) mit einem virusspezifischen Virussuspension-Beladungspuffer-Gemisch und entsprechenden Volumina beladen. In Tabelle 5 sind die für die verschiedenen Viren verwendeten Konditionen aufgezeigt. Die Elution des Virus vom Keimträger erfolgte in 2 ml Elutionspuffer (2 % Fleischextrakt in 0,5 M NaCl, pH 7,0; Nazir et al. 2010) mit anschließender Ultraschallbehandlung im Eisbad (40 kHz) für 3 min. (KHV) bzw. 5 min. (HVAV, VHSV, IHNV) und Zentrifugation bei 2000 x g für 15 min bei 4 °C. Der Virustiter wurde nach der Endpunkt-Verdünnungsmethode bestimmt.

Tabelle 5: Schema für die Herstellung der Sandwichkeimträger

Virus	Virus-Verdünnung	Beladungspuffer	Volumen [ml]
HVAV	1:10	Phosphat-Beladungspuffer pH 7,0	10
KHV	1:3	Phosphat-Beladungspuffer pH 7,0	5
VHSV	1:3	RTG-2/f Zellkulturmedium	5
IHNV	1:5	Phosphat-Beladungspuffer pH 6,0	10

2.9 Feststellung der pH-Sensitivität aller Testviren

Die Tenazität der Testviren wurde bei den pH-Werten 3, 5, 7, 10, 11, 12 in einem Suspensionsversuch bei drei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 10 °C, 20 °C) untersucht. Die untersuchten pH-Werte wurden mittels 1 M HCL bzw. 1 M NaOH eingestellt, als Medium wurde 10 mM HEPES in Aqua bidest. verwendet (Brown et al. 2009). Die Versuche wurden zweistufig durchgeführt, in erster Stufe in Form eines Suspensionstests, in zweiter Stufe als Sandwichkeimträgertest.

Zunächst wurden die Reaktionsgefäße und Medien 24 h vor Versuchsbeginn auf die jeweilig zu testende Temperatur eingestellt. Pro Versuchsansatz wurden je drei Replikate eingesetzt. Im Suspensionsversuch wurden pro Replikat 49,5 ml 10 mM HEPES in A. bidest. und 0,5 ml quantifizierte Virussuspension verwendet, so dass eine Verdünnung von 1:100 vorlag. Die Probenahmen erfolgten zum Zeitpunkt t_0 (t_0 entsprach 1 min nach Zugabe des Virus), nach 15 min, 30 min, 1 h, 2 h und 4 h. Es wurden jeweils 100 µl der Suspension entnommen und sofort eine dekadische Verdünnungsreihe erstellt. Der pH-Wert wurde bei jeder Probenahme gemessen. Im Keimträgerversuch wurden jeweils 50 ml des auf den jeweiligen pH-Wert eingestellten Medium-Virusgemisches verwendet und die Keimträger zugegeben. Die Proben wurden nach 15 min, 4 h und 24 h genommen und jeweils der pH-Wert gemessen. Das Virus auf den Keimträgern wurde, wie in Kapitel 2.8 beschrieben, eluiert und der Virustiter bestimmt (Kapitel 2.7).

Nach Erhalt der ersten Ergebnisse wurde dieser Versuchsteil um die Untersuchung der pH-Wert-Verschiebung mittels $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Calciumhydroxid oder Löschkalk) bei pH 10, 11, 12 sowie der Verwendung der Sandwichkeimträgermethode erweitert.

2.10 Etablierung eines Nachweises der Testviren in verschiedenen Matrices (Wasser, Teichschlamm, Erde)

Für den Nachweis der Tenazität der Testviren in den verschiedenen Matrices wurde die Sandwichkeimträgermethode verwendet. Als Matrices wurden Oberflächenwasser und Teichschlamm aus einer Aquakultur (Landkreis Calw) sowie dem Hohenheimer Eiszeitteich verwendet. Die Tenazität wurde bei drei Temperaturen (4 °C, 10 °C, 20 °C) getestet. Pro Temperatur und Matrix wurden je 3 Replikate eingesetzt. Das Oberflächenwasser bzw. der Teichschlamm wurden in 50 ml Reaktionsgefäße gegeben. Die mit Virus beladenen Sandwichkeimträger wurden hinzugefügt und vollständig mit Teichschlamm bedeckt. Die Reaktionsgefäße wurden mit dem Oberflächenwasser bzw. Teichschlamm gefüllt, um luftdichte Verhältnisse zu schaffen. Nach 1, 14, 28, 42 Tagen wurden Proben zur Isolierung der Viren entnommen. Die Viren auf den Keimträgern wurden, wie in Kapitel 2.8 beschrieben, eluiert und der Virustiter bestimmt (siehe Kapitel 2.7).

2.11 Prüfung der viruziden Wirkung von Desinfektionsmitteln

2.11.1 Desinfektionsmittel

Es wurden folgende sechs Desinfektionsmittel als Reinsubstanz getestet: Ameisensäure als Vertreter der organischen Säuren, Formalin als Vertreter der Aldehyde, Didecyl-dimethylammoniumchlorid als Vertreter der quaternären Ammoniumverbindungen, Polyvinylpyrrolidone-Iod-Komplex (Povidon-Iod) als Iod-Verbindung, Kalkmilch mit pH 12 (Calcium hydroxid) und Peressigsäure als Vertreter der Peroxidverbindungen.

2.11.2 Desinfektionsmittelprüfung

Die Durchführung der Desinfektionsmittelprüfung erfolgte nach den Richtlinien der DVG (DVG 2007). Die Wirkung der Desinfektionsmittel wurde bei drei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 10 °C, 20 °C) und vier verschiedenen Zeitpunkten (15 min, 30 min, 60 min, 120 min) untersucht. Das verwendete Verfahren wurde in 3 Schritten durchgeführt. Der erste Schritt umfasste die Vorprüfung Teil I (Vorprüfung Teil I nach DIN EN 14476; CEN 2006) mit einem Zytotoxizitätstest und einem Interferenztest. Der zweite Schritt bestand aus der Überprüfung der viruziden Wirkung im quantitativen Suspensionstest (Vorprüfung Teil II nach DVG – Richtlinie), gefolgt vom dritten Schritt bestehend aus Keimträgerversuchen mit Sandwichkeimträger und Metallkeimträger (Hauptprüfung nach DVG-Richtlinie).

Ursprünglich sollten pro Desinfektionsmittel drei Konzentrationen getestet werden. Als Anfangskonzentration wurde die Konzentration der in den handelsüblichen Desinfektions-

mitteln verwendeten Konzentration der Reinsubstanzen gewählt. Anhand der Ergebnisse der Suspensionsversuche wurden die Konzentrationen der Desinfektionsmittel nach oben bzw. nach unten korrigiert.

Im anschließenden Keimträgerversuch (Hauptversuch) wurden zunächst nur die Konzentrationen getestet, welche eine Reduktion des Virustiters bis zur Nachweisgrenze (NWG) bewirkten.

2.11.3 Zytotoxizitätstest

Zunächst wurde mittels Zytotoxizitätstest nach der Richtlinie DIN EN 14476 (CEN 2006) die zytotoxische Wirkung der verwendeten Desinfektionsmittel auf die verwendeten Zelllinien untersucht, um die virusbedingten zytopathischen Effekte gegenüber den von den verwendeten Desinfektionsmitteln induzierten zelltoxischen Effekten abzugrenzen. Mit jeder Desinfektionsmittelkonzentration wurde eine dekadische Virus-Verdünnungsreihe hergestellt. Die Verdünnung der Desinfektionsmittel erfolgte im jeweiligen Erhaltungsmedium für die einzelnen Zelllinien. Zellkultur-Mikrotiterplatten wurden mit je 100 µl der entsprechenden Desinfektionsmittel-Verdünnungen pro Vertiefung (4 parallele Vertiefungen pro Verdünnungsstufe) beschickt. Auf die vier Vertiefungen der Zellkontrolle wurden 100 µl Erhaltungsmedium pro Vertiefung pipettiert. Die Zellkulturplatten wurden bei den jeweiligen Virusvermehrungstemperaturen (Tabelle 4) inkubiert und nach 24 h und 48 h lichtmikroskopisch auf zelltoxische Effekte begutachtet und dokumentiert. Für den nachfolgenden Interferenztest wurde die Verdünnungsstufe der jeweiligen höchsten Konzentration, in welcher kein sichtbarer zelltoxischer Effekt auftrat, eingesetzt.

2.11.4 Interferenztest

Der Interferenztest wurde nach der Richtlinie DIN EN 14476 (CEN 2006) durchgeführt, um die Suszeptibilität der verwendeten Zelllinien gegenüber den jeweiligen Virus-Spezies nach der Behandlung mit den jeweiligen Desinfektionsmitteln zu überprüfen. Die Verdünnung der Desinfektionsmittel erfolgte im jeweiligen Erhaltungsmedium für die einzelnen Zelllinien. Die Mikrotiterplatten mit Zellrasen wurden zunächst mit jeweils 100 µl der verdünnten Desinfektionsmittellösungen beschickt und für 1 h bei 15 °C inkubiert. Danach wurden die Desinfektionsmittellösungen entfernt, der Zellrasen gewaschen und jede Vertiefung mit 100 µl einer dekadischen Virus-Verdünnungsreihe in Erhaltungsmedium (bis Faktor 10^{-10}) beschickt. Die vier Vertiefungen der Zellkontrolle wurden mit jeweils 100 µl Erhaltungsmedium versehen. Die Mikrotiterplatten wurden für sieben Tage bei den für die

einzelnen Viren angegebene Temperaturen inkubiert, lichtmikroskopisch auf CPE überprüft und dieser dokumentiert. Anschließend wurden die Virustiter ermittelt.

2.11.5 Prüfung der viruziden Wirkung im Suspensionsversuch

Die Empfindlichkeit der verwendeten Fischviren gegen Desinfektionsmittel wurde in der sog. Vorprüfung entsprechend den von dem Desinfektionsmittelausschuss der DVG herausgegebenen Prüfrichtlinien für virale Erreger (DVG 2007) in einem Suspensionsversuch untersucht. Verwendet wurden die in 2.11.1 aufgezählten Wirkstoffe in verschiedenen Konzentrationen unter drei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 10 °C, 20 °C). FKS wurde als Eiweissbelastungssubstanz in einer Konzentration von 6 % verwendet.

Zunächst wurden alle Reaktionsgefäße und Substanzen bzw. Lösungen auf die jeweilige Versuchstemperatur eingestellt und anschließend die Versuchsreaktionslösungen hergestellt bestehend aus 10 Volumenteil (VT) quantifizierte Virussuspension (2 ml), 8 VT FKS (1,6 ml) und 2 VT Wirkstofflösung in 10-fach konzentrierter Anwendungskonzentration. Den Kontrollansätzen wurden anstelle der Wirkstofflösungen PBS hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C, 10 °C oder 20 °C im Inkubator, nach 15 min, 30 min, 60 min und 120 min wurden Proben entnommen. Der Kontrollreaktionslösung wurde nach 15 min. und 120 min. jeweils ein Probenvolumen von 100 µl entnommen. Daraus wurden die Virustiter nach der Endpunkt-Verdünnungsmethode bestimmt und als KID_{50}/ml berechnet.

2.11.6 Prüfung der viruziden Wirkung im Keimträgertest

Im nächsten Schritt wurde die Empfindlichkeit der Fischviren gegenüber den zu testenden Wirkstoffen der Desinfektionsmittel entsprechend der DVG-Prüfrichtlinien (DVG 2007) in der sog. Hauptprüfung im Keimträgertest überprüft. Die Keimträger wurden nach der unter 2.8 beschriebenen Methode hergestellt und mit den Fischviren beladen. Der Einsatz der Desinfektionsmittel erfolgte in verschiedenen Konzentrationen unter drei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 10 °C, 20 °C). Die Inkubation erfolgte bei 4 °C, 10 °C oder 20 °C im Inkubator, nach 15 min, 30 min, 60 min und 120 min wurden Proben entnommen. Aus diesen Proben wurden die Titer der Restviren mittels Endpunkt-Verdünnungsmethode bestimmt und als KID_{50}/ml berechnet.

2.12 Feststellung der Resistenz der Viren gegen Trocknung

Um die Empfindlichkeit der Fischviren gegen Trocknung zu untersuchen, wurden die unterschiedlichen Viren auf Holz-, Metall- und Sandwichkeimträger aufgebracht und die Inaktivierung der Viren durch Antrocknung untersucht.

Die Feststellung der Resistenz der Viren gegen Trocknung auf Holz und Metall erfolgte in Anlehnung an die Prüfrichtlinien der DVG (Holzkeimträger, DVG 2007) und der CEN (Metallkeimträger; CEN 2011). Die Resistenz gegenüber der Trocknung wurde unter Proteinbelastung mit FKS getestet. Dafür wurden 10 Volumenteile (VT) quantifizierte Virussuspension mit 8 VT fötalem Kälberserum (FKS) versetzt. Von dem Virus-Protein-Gemisch wurden jeweils 50 µl auf die Keimträger aufgebracht. Nach verschiedenen Zeitpunkten (Zeitpunkt 0, 45 min, 60 min, 90 min) wurde das Virus von den Keimträgern re-isoliert. Die Zeta plus Virosorb 1 MDS Filter wurden mit 2 ml PBS in 15 ml Reaktionsgefäße gegeben und anschließend mit Ultraschall (40 kHz) im Eisbad (0-4 °C) für 3 Minuten (KHV) bzw. 5 Minuten (HVAV, VHSV) beschallt, sowie bei 2000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert (Hanert 2011). Aus diesen Proben wurden die Titer der Restviren mittels Endpunkt-Verdünnungsmethode bestimmt und als KID_{50}/ml berechnet.

2.13 Feststellung der Resistenz der Viren gegenüber Wärmeinwirkung

Für die Untersuchung der Empfindlichkeit der getesteten Viren gegenüber unterschiedlichen Temperaturen wurden quantifizierte Virussuspensionen den Temperaturen 25 °C, 40 °C, 55 °C, 70 °C über verschieden lange Zeitintervalle ausgesetzt. Die Einwirkzeiten wurden temperaturabhängig ausgewählt und sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Einwirkzeiten bei verschiedenen Temperaturen

Temperaturen	Einwirkzeiten
25 °C	t_0 , 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, t_0 , 1 d, 3 d, 6 d, 9 d, 12 d, 15 d, 18 d, 21 d
40 °C	t_0 , 15 min, 30 min, 60 min, 120 min,
55 °C	t_0 , 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 10 min
70 °C	t_0 , 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 10 min

Bei jedem Temperaturansatz wurden drei Replikate durchgeführt. Von jeder Virussuspension wurde pro Temperatur, Einwirkzeit und Replikat je 1 ml in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert (Frerichs et al. 2000). Der Versuch wurde im Thermoblock durchgeführt. Nach den entsprechenden Einwirkzeiten wurden zum Abbruch der Reaktion die Reaktionsansätze für 2

min in ein Eisbad (0 °C) gestellt. Aus diesen Proben wurden umgehend die Titer der Restviren mittels Endpunkt-Verdünnungsmethode bestimmt und als KID_{50}/ml berechnet.

2.14 Messung der Wirkung verschiedener Brannt- und Löschkalkbehandlungen auf Fischviren unter unterschiedlichen Bedingungen (Laborteich-Versuche)

Für die Laborteiche wurden Oberflächenwasser und Teichschlamm aus zwei unterschiedlichen naturnahen Teichen (Aquakultur Landkreis Calw und Hohenheimer Eiszeitteich), sowie ein künstliches Sediment verwendet. Das künstliche Sediment wurde nach einem von OECD/OCDE 2004 beschriebenen Protokoll hergestellt. Für die Wassersäule wurde Wasser standardisierter Härte (pH 7,0) entsprechend der Prüfrichtlinie der DVG verwendet (DVG 2007). Abbildung 1 zeigt den Aufbau eines Laborteiches.

Abbildung 1: Laborteich mit eingebrachten Sandwichkeimträgern



Im Laborteich wurden jeweils zwei Sandwichkeimträger pro Probenstag (Tag 1, 3, 5) in einer Sedimenttiefe von 3 cm, an der Sedimentoberfläche und im Wasser ausgebracht. Die Inkubation der Laborteiche erfolgte bei 4 °C. Als Desinfektionsmittel wurden Branntkalk in einer Konzentration von 0,5 kg/m³ und Löschkalk in einer Konzentration von 100 g/m³ eingesetzt. In beiden Fällen wurde nachdosiert, bis im Wasser ein pH-Wert von 12 erreicht war. Zusätzlich wurde die Wirkung der Kalkbehandlung bei pH 11 getestet. Der pH- Wert im Wasser wurde während der Versuche auf 11 bzw. 12 gehalten. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuchsansätze durchgeführt.

Die Kalkung erfolgte anfangs wie für die Desinfektion nach Virusausbrüchen vorgeschrieben (OIE 2009), indem die zwei Kalkarten direkt auf die Sedimentoberfläche ausgebracht wurden. Es hat sich gezeigt, dass dies im Laborversuch nicht praktikabel war und der Kalk, v.a. der Branntkalk, nur schwer in Lösung überging. Aus diesem Grunde wurde in den nachfolgenden Versuchen der Kalk nicht mehr direkt auf das Sediment gegeben, sondern vorher in einem Gefäß mit Teichwasser gelöst, so dass eine Kalkmilch entstand. Diese wurde anschließend auf die Wassersäule gegeben.

2.15 Feldversuche

In Feldversuchen wurde die Desinfektionswirkung von Branntkalk in Aquakulturanlagen nach Virusausbrüchen untersucht. Dafür wurde der aus dem Virusausbruch isolierte Virusstamm verwendet und die Desinfektionsmaßnahmen mittels der Sandwichkeimträgermethode begleitet.

Die Fischteiche waren dazu nicht bespannt (nicht mit Wasser gefüllt). Zunächst wurden Sandwichkeimträger im Sediment (3 cm Tiefe) und an der Sedimentoberfläche ausgebracht. Anschließend erfolgte die Desinfektion entsprechend OIE-Vorgaben (OIE 2009) mittels Branntkalk (ca. 0,5 kg/m³) bzw. Löschkalk (100 g/m³). Nach der Bespannung der Teiche wurden die Sandwichkeimträger an der Wasseroberfläche ausgebracht. Die Beprobung der Teiche erfolgte am 1., 3. und 5. Tag.

Insgesamt konnten drei Desinfektionsmaßnahmen nach VHSV-Ausbrüchen begleitet werden. Der erste Feldversuch wurde in einer Aquakulturanlage im Landkreis Schwäbisch Hall durchgeführt. Für diesen Freilandversuch wurden Sandwichkeimträger nach Nazir et al (2010) mit dem Freilandvirus FV 58/2 (VHSV) hergestellt und verwendet. Bei diesem Feldversuch wurden 3 Forellenteiche über 5 Tage beprobt. Bei einem Teich war eine Beprobung im Sediment nicht möglich, da dieser bereits geflutet und mit Löschkalk vorbehandelt war. Die Teiche wurden mittels Branntkalk desinfiziert und auf einen pH von 12 eingestellt.

Der zweite Freilandversuch wurde im Landkreis Karlsruhe in einer Aquakulturanlage mit dem Freilandvirus FV 22/1 (VHSV) durchgeführt. Insgesamt wurden 4 Forellenteiche beprobt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie beim ersten Freilandversuch. Zusätzlich wurde der aus den Teichen ausgehobene Boden untersucht. Zum einen wurde noch ungekalkter Teichboden mit Sandwichkeimträgern in Tiefen von 3 cm, 5 cm, 10 cm (welcher anschließend gekalkt wurde) und zum anderen bereits mit Branntkalk durchmischter Teichboden in einer Tiefe von 10 cm beprobt.

Der dritte Freilandversuch wurde in einer Aquakulturanlage im Landkreis Ortenaukreis mit dem Freilandvirus Vi 1451 (VHSV) durchgeführt. Insgesamt wurden 4 Forellenteiche beprobt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie beim ersten Freilandversuch. Zwei der Teiche wurden nicht mit Wasser gefüllt, so dass hier die Beprobung im Sediment (3 cm Tiefe) und an der Sedimentoberfläche durchgeführt werden konnte.

2.16 Literaturstudie zur Ökotoxikologie von Desinfektionsverfahren

Um die Lücken in der ökotoxikologischen Beurteilung von Desinfektionsmitteln oder –verfahren durch ökotoxikologische Tests zu schließen, wurde eine Literaturstudie zur Umweltverträglichkeit der Fischteichdesinfektion nach Ausbrüchen infektiöser Virusepidemien bei Cypriniden und Salmoniden durchgeführt

2.17 Ökotoxikologisches Tests

Die ökotoxikologischen Tests wurden durch das Fraunhofer IME, Schmallenberg, und das Forschungsinstitut gaiac, Aachen durchgeführt.

Im Juli 2011 und 2012 wurden jeweils 2 akute ökotoxikologische Tests mit der Eintagsfliege *Habrophlebia lauta* (Testdauer 96h, Endpunkte Mortalität und Immobilität) und dem Bachflohkrebs *Gammarus pulex* (Testdauer 96h, Endpunkte Mortalität) durchgeführt. Für die Studien wurden Freilandfänge aus unbelasteten Herkunftsgewässern eingesetzt. Die Eintagsfliegen und Bachflohkrebse wurden aus der Inde zwischen Raeren und Schmidthof bzw. aus der Glenne zwischen Rüthen und Warstein gesammelt. In Absprache mit den Projektpartnern wurden die Desinfektionsmittel Halamid®/Chloramine T sowie eine pH-Wertreihe mit CaO getestet.

Bei der getesteten Eintagsfliege handelt es sich um eine allgemein im Berg- und Hügelland verbreitete Art aus der Familie der Leptophlebiidae. Ihr Verbreitungsschwerpunkt liegt im Epi- bis Metarhithral bei xeno- bis β -mesosaprobien Verhältnissen, wobei langsamer fließende Bereiche auf Steinen und im Grobdetritus bevorzugt werden. Es handelt sich um eine univoltine Art mit ganzjährigem Larvenvorkommen und einem deutlichen Nachweismaximum in den Gewässern von Mitte Mai bis Juli. Die Emergenz der Imagines erfolgt von Juni bis September mit einem Schwerpunkt im Juni und Juli. Aufgrund der Größe der Larven und den Zeitpunkt der Probenahme handelte es sich bei den im Test eingesetzten Larven um ältere Larvenstadien, es wurde jedoch darauf geachtet, keine Nymphen einzusetzen.

Der akute Test hatte eine Dauer von 96h mit Kontrolle der beiden Endpunkte Mortalität und Immobilität alle 24h. Es wurden insgesamt 10 Kontrollen und 3 Replikate pro Konzentrationsstufe mit jeweils 7 Tieren je Gefäß angesetzt. Temperatur und Lichtverhältnisse wurden entsprechend den Gegebenheiten im Herkunftsgewässer konstant eingestellt, jedes Testgefäß wurde belüftet, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Bei dem Versuch mit CaO wurde ein semistatistischer Ansatz mit täglichem Wechsel des Medium gewählt, da der pH-Wert durch die notwendige Belüftung innerhalb weniger Stunden jeweils wieder in den Bereich der Kontrollen abgesunken war. Die Kontrolle und Testansätze mit Halamid®Chloramine T wurden statisch getestet.

Der Bachflohkrebs (*Gammarus pulex*) aus der Familie der Gammaridae ist ein in Europa und Zentralasien beheimateter Süßwasserkrebs, welcher zu den Flohkrebse (Amphipoda), einer Ordnung der Krebstiere, gehört. Die Art ist in Bächen im Flach- und Hügelland bis zu einer Höhe von ca. 400m über NN verbreitet. Die Versuchstiere wurden im Juli 2012 in der Glenne bei Warstein, unterhalb des Schloss Körtlinghausen gesammelt. Die Sammelstelle befindet sich in einem schmalen Seitenarm im unteren Drittel des 17,1 km langen Flusses wo das Gefälle gering ist. Die umgebende Flora ist durch Schwarzerlen geprägt. Zum Sammeln der Tiere wurde Sediment ausgesiebt, das charakterisiert war durch eine hohe Feinkörnigkeit und einen hohen organischen Anteil. Der Inhalt des Siebs wurde dann in einen Eimer mit Flusswasser überführt.

Im Labor wurden die Tiere aus dem Wasser/Sedimentgemisch in Cu-freies Wasser (18°C) überführt. In die Haltungsbecken wurden Blätter und einzelne Steine und als Sedimentersatz eingesetzt, um den Tieren Nahrung und Unterschlupf zu bieten.

Die Beleuchtung mit einem Hell/Dunkel-Rhythmus von 16:8h entsprach ungefähr den natürlichen Lichtverhältnissen.

Die Studie mit Brandkalk (CaO) wurde semistatistisch mit Medienwechsel alle 24h durchgeführt, da der pH nicht konstant gehalten werden konnte. Eine pH-Reihe von 8,5/9,0/9,5/10,0/10,5 wurde getestet. Dafür wurde eine übersättigte Stammlösung hergestellt. Nach Ausflockung des Brandkalks, wurden verschiedene Mengen der überstehenden Lösung in Cu-freies Wasser pipettiert. Die jeweils benötigte Menge zur Einstellung der Verdünnungsstufen wurde durch ein pH-meterbestimmt. Es wurde so lange Stammlösung zugegeben, bis der gewünschte pH-Wert erreicht war. Jedes Versuchsbecken einer Behandlungsstufe (n=4) wurde mit 5 Tieren besetzt.

Der pH wurde täglich vor dem Wechsel des Mediums sowohl in der alten, als auch in der neuen Lösung in einem separaten Testgefäß (ohne Gammariden) gemessen. Die Sauerstoffkontrolle fand jeweils parallel zur pH-Kontrolle statt.

Bei der Studie mit Halamid® (Chloramine T) wurden Testkonzentrationen von 0.25 bis 50mg/L eingesetzt. Die Behandlungsgruppen (n=4) wurden mit einer unbelasteten Kontrollgruppe (n=4) verglichen. Die Versuchsbecken wurden jeweils mit 5 Tieren besetzt.

Die Kontrolle der Endpunkte erfolgte einmal täglich (24h Rhythmus nach Testansatz). Als toxikologische Endpunkte wurde die Mortalität der Tiere.

2.18 Ökologisches Monitoring von Desinfektionsverfahren in Teichanlagen

Der Ablauf der ökologischen Monitorings folgte immer einem gleichen Schema. Im Vorlauf des Versuchs wurden einer oder mehrere Versuchsteiche mit Löschkalk auf einen maximalen pH von 12 gebracht. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Makrozoobenthoszönose nach den Standardverfahren der Wasserrahmenrichtlinie mit anschließender Lebensortierung, wobei die unterschiedlichen Substrattypen zunächst kartiert und anschließend anteilig berücksichtigt werden (Meier et al. 2006). Durch das einheitliche Verfahren sind eine Vergleichbarkeit der einzelnen Proben, sowie eine Abundanzbestimmung möglich. Die Probenahme erfolgte routinemäßig an drei Messpunkten. Oberhalb der Fischzuchtanlage, direkt an der Einleitstelle und ca. 100 m unterhalb der Einleitstelle. Zur Erfassung der ungestörten Lebensgemeinschaft wurden alle drei Stellen vor dem Ablassen des gekalkten Wassers untersucht. Außerdem wurden Wasserproben für die nährstoffchemische Analyse genommen und die physiko-chemischen Parameter gemessen. Anschließend erfolgte ein kontrolliertes Ablassen der gekalkten Versuchsteiche über mehrere Stunden. Dabei wurde durch regelmäßige Messungen der sohnahen Strömungsgeschwindigkeiten darauf geachtet, dass keine hydraulischen Veränderungen im Untersuchungsgewässer auftraten. Gegebenenfalls wurde die Menge des einströmenden Wassers reduziert. Außerdem erfolgte eine Überwachung der pH-Werte an der Einleitstelle sowie im Streckenverlauf unterhalb. Die Erhöhung des pH im Bachverlauf fiel dabei wie erwartet deutlich niedriger als an der direkten Einleitung aus. Spätestens 2 Stunden nach Beendigung des Ablassens des gekalkten Wassers lag der pH an allen Probenahmestellen unterhalb wieder im Bereich der Werte oberhalb und die Beprobung der Makrozoobenthosgemeinschaft nach der Teichleerung erfolgte. Im Normalfall wurden somit je 5 Makrozoobenthosproben je Versuch gewonnen.

Im Folgenden erfolgt eine kurze Beschreibung der Besonderheiten eines jeden Versuchs. Die Artenlisten sowie eine Tabelle mit physiko-chemischen Messdaten zu jedem Versuch sind im Anhang II dargestellt.

- Vom 8.-9.03.2012 wurde ein ökologisches Monitoring begleitend zu einer routinemäßigen Desinfektionsmaßnahme der Zuchtanlage des Bezirksfischereivereins Nagoldtal e.V. in Kentheim durchgeführt. Im Rahmen des Monitorings wurde das Makrozoobenthos an 3 Probenahmestellen (PNS) im Rötelbach untersucht. Die erste PNS liegt ca. 150 m oberhalb der Anlage und dient als von der Fischzuchtanlage unbeeinträchtigter Referenzstandort. Die weiteren PNS liegen direkt am Zulauf der beiden Versuchsteiche in den Bach sowie etwa 100 m unterhalb des Zulaufs. Die Leerung der beiden Versuchsteiche dauerte ca. 4 Stunden und führte zu einem maximalen pH von 9,9 im Bach an der Einleitstelle.
- Vom 16.-18.4.2012 wurde ein weiterer Versuch in der Teichanlage Berger in Calmbach durchgeführt. Abweichend zu den anderen Versuchen wurden hier zwei Probenahmestellen ca. 70 m und 150 m unterhalb der Einleitstelle untersucht. Das Ablassen des gekalkten Wassers dauerte 5 Stunden und der pH im Würzbach stieg dabei auf einen maximalen Wert von 11 an.
- Die ebenfalls am Würzbach etwas unterhalb der Anlage Berger stationierte Zuchtanlage Kelp wurde vom 27.8.-30.8.2012 untersucht. Makrozoobenthosproben wurden hier an drei Stellen genommen und die Leerung der Teiche erfolgte über 1,5 Tage mit pH-Werten im Würzbach größtenteils zwischen 9,7 und 10,7.
- Vom 28.-29.8.2012 wurde parallel zu dem Versuch Kelp ein weiterer Versuch in der an der kleinen Enz gelegenen Teichanlage Vollmer durchgeführt. Das Ablassen des Versuchsteichs erfolgte vom Abend des 28.8. bis zum Vormittag des 29.8. wobei es zu einer Unterbrechung während der Nacht gekommen ist. Der pH an der Einleitstelle in die kleinen Enz stieg hier bis maximal 11,4 an.
- Ein weiterer Versuch erfolgte in Seelbach an der Fischteichanlage Drafehn am 21.5.2012 sowie vom 4.-5.6.20012. Hier lagen zwischen Kalkung der Anlage und der Leerung der Teiche ca. 2 Wochen. Daher erfolgte die Probenahme hier zu zwei Zeitpunkten um die Ergebnisse der Untersuchungen ungestörten Zustands vor der Kalkung nicht durch eventuell auslaufendes Kalkwasser in den Schuttelbach zu verfälschen. Am 21.5. wurden daher die Beprobung der Einleitstelle sowie der Stelle unterhalb der Einleitung vorgenommen. Anschließend erfolgte die Befüllung der

Anlage und das Einbringen des Löschkalks. In den Teichen wurde dabei ein maximaler pH von 12 bis 13 erreicht. Nach ca. 14 Tagen wurden die Teiche in den Schüttelbach entleert mit anschließender Durchführung des Monitorings. Da es nicht möglich war bei dem Ablassen vor Ort zu sein, liegen hier keine Messungen des pH im Schüttelbach während der Einleitung vor.

Im August 2013 wurden in Absprache mit dem Projektleiter erneut Makrozoobenthosproben an den Einleitstellen der Teichanlagen Kentheim, Berger, Vollmer und Kelp genommen. Diese dienten zur Überprüfung der Langfristigkeit möglicher Effekte aus 2012 und waren möglich, da keine weiteren Fischzuchtanlagen für zusätzliche Untersuchungen vorlagen.

3 Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Herstellung hochtitriger Virussuspensionen

Zur Herstellung der Virussuspensionen wurden vier verschiedene Referenzstämme (VHSV, HVAV, KHV, IHNV) sowie drei Feldisolate des VHS-Virus in den für das jeweilige Virus permissiven Zell-Linien vermehrt. Die Laborarbeiten wurden in Absprache mit dem Referenzlabor für Fischseuchen des Friedrich-Loeffler-Instituts (Insel Riems) durchgeführt. Dabei konnten hochtitrige Virussuspensionen ($KID_{50}/ml \geq 10^6$) für alle für die weiteren Versuche verwendeten Testviren erzeugt werden. Eine Übersicht über die erreichten Titerstufen ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Titerwerte der hergestellten Virussuspensionen der untersuchten Fischviren

Vermehrtes Virus	Maximalwerte der Titer der Virussuspensionen (KID_{50}/ml^1)
Referenzviren	
VHSV 1087	10^8
HVAV 110	10^8
KHV-T	$10^{6,75}$
IHNV 250	$10^{7,75}$
Feldvirus-Isolate	
FV 58/2 (VHSV)	$10^{7,25}$
FV 22/1 (VHSV)	$10^{7,5}$
Vi 1451 (VHSV)	$10^{6,5}$

¹ kulturinfektiöse Dosis

Bei der Herstellung der Virussuspensionen zeigte sich, dass v.a. in den Sommermonaten durch erhöhte Raumtemperaturen im Labor Schwierigkeiten bei der Herstellung von stabil hochtitrigen Virussuspensionen (v.a. KHV, IHNV) auftraten.

3.1.2 Herstellung von Sandwichkeimträgern mit hohen Virustitern

Um für jedes Virus ein optimales Ergebnis zu erreichen, hat sich gezeigt, dass die Methode für jedes Virus spezifisch angepasst werden musste. Die Entwicklung einer einheitlichen optimalen Methode für die Herstellung von Sandwichkeimträgern für Fischviren war nicht möglich, i.e. für jedes Fischvirus wurde die Sandwichkeimträgermethode individuell angepasst.

Die für den Referenzstamm VHSV 1087 optimierte Sandwichkeimträgermethode konnte erfolgreich auf die VHS-Freilandstämme FV 58/2, FV 22/1 und Vi 1451 übertragen werden. In Tabelle 8 sind die durchschnittlichen Virustiter der Sandwichkeimträger und der für deren Herstellung verwendeten Virussuspensionen zusammengefasst.

Tabelle 8: Titerstufen der Sandwichkeimträger und deren Ausgangsvirus-suspensionen

Vermehrtes Virus	Titerwerte der Virussuspensionen (KID₅₀/ml¹)	Durchschnittliche Titerwerte der Sandwichkeimträger (KID₅₀/ml)
Referenzviren		
VHSV 1087	10 ^{8,0}	10 ^{4,5} -10 ^{5,25}
HVAV 110	10 ^{7,0}	10 ^{5,0} -10 ^{6,25}
KHV-T	10 ^{6,5}	10 ^{5,0}
IHNV 250	10 ^{6,0} -10 ^{8,0}	10 ^{5,92} -10 ^{6,25}
Feldvirus-Isolate		
FV 58/2 (VHSV)	10 ^{7,25}	10 ^{6,25}
FV 22/1 (VHSV)	10 ^{7,5}	10 ^{4,75}
Vi 1451 (VHSV)	10 ^{6,5}	10 ^{5,0}

¹ kulturinfektiöse Dosis

3.1.3 Feststellung der pH-Sensitivität von VHSV, HVAV und KHV

Zur Untersuchung der Empfindlichkeit der Testviren gegenüber verschiedenen pH-Bedingungen wurde die Stabilität der verschiedenen Viren gegenüber unterschiedlichen pH-Werten (pH 3, 5, 7, 10, 11, 12) bei drei unterschiedlichen Temperaturen (4 °C, 10 °C, 20 °C) über die Zeit (maximal 24 h) untersucht. Die Untersuchungen wurden in Analogie zur Desinfektionsmittelprüfung der DVG in 2 Stufen (Suspensionstest, Sandwichkeimträgertest) durchgeführt. Die alkalischen pH-Werte 10, 11 und 12 wurden zum Vergleich der Wirksamkeit zum einen mit NaOH und zum anderen mit Kalkmilch Ca(OH)₂ eingestellt.

Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen sind in den Tabellen 9-20 zusammenfassend dargestellt.

Der Titer des VHSV 1087 wurde im Suspensionstest bei einem pH-Wert von 3 (eingestellt mit HCl) bei 4 °C nach mindestens 4 h, bei 20 °C nach mindestens 1 h um 4 log₁₀-Stufen reduziert. Eine Reduktion in diesem Maßstab war im Labor bei 10 °C und einem pH-Wert von 3 nicht innerhalb von 4 h möglich. Bei einem pH-Wert von 5 konnte nur eine Reduktion

des Virustiters von VHSV innerhalb von 4 h von maximal 2,5 log₁₀-Stufen (bei 10 °C) erreicht werden. Bei pH 7 war der Virustiter bei allen Temperaturen über die 4 h stabil. Die Untersuchungen bei pH 10 und pH 12 (eingestellt mit NaOH) zeigten für das VHSV, dass der Titer des Testvirus innerhalb von 4 h nahezu unverändert blieb. Bei pH 12 (NaOH) wurde über 4 h nur eine Titerreduktion um ca. 1-1,5 log₁₀-Stufen bei allen 3 Testtemperaturen erreicht. Die Ergebnisse des Suspensionstest sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: pH-Sensitivität von VHS-Virus 1087 im Suspensionstest (HCl, NaOH)

pH-Wert ¹	4 °C	10 °C	20 °C
3	4 h ²	n.i. ³	1 h
5	n.i.	n.i.	n.i.
7	n.i.	n.i.	n.i.
10	n.i.	n.i.	n.i.
11	n.i.	n.i.	n.i.
12	n.i.	n.i.	n.i.

¹ pH-Werte wurden mit NaOH bzw. HCl eingestellt

² Zeit, die mindestens benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Dieser Wert gilt entsprechend der Desinfektionsrichtlinien der DVG im Suspensionstest als ausreichend für einen Desinfektionserfolg.

³ n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nicht möglich

Wurden die pH-Werte 10-12 mit Hilfe von Ca(OH)₂ eingestellt, wurde der Virustiter von VHSV nur bei einem pH-Wert von 12 und einer Temperatur von 20 °C um mindestens 4 log₁₀-Stufen reduziert. Dazu war eine Inkubationszeit von mindestens 2 h nötig (Tabelle 10).

Tabelle 10: pH-Sensitivität von VHS-Virus 1087 im Suspensionstest (Ca(OH)₂)

pH-Wert ¹	4 °C	10 °C	20 °C
10	n.d. ⁴	n.i. ³	n.i.
11	n.d.	n.i.	n.i.
12	n.i.	n.d.	2 h ¹

¹ pH-Werte wurden mit Ca(OH)₂ eingestellt

² Zeit, die benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Dieser Wert gilt entsprechend der Desinfektionsrichtlinien der DVG im Suspensionstest als ausreichend für einen Desinfektionserfolg.

³ n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nicht möglich

⁴ nicht durchgeführt

Die Ergebnisse der Sandwichkeimträgertests zur weitergehenden Analyse der pH-Sensitivität sind für das VHSV in den Tabellen 11 und 12 zusammenfassend dargestellt. In diesem Test zeigte sich, dass der Titer von VHSV auf der Oberfläche der Keimträger nur bei einem pH von 11 oder 12 und einer Temperatur von 20 °C um mindestens 4 log₁₀-Stufen reduziert wurde. Wurde der pH der Suspension mit NaOH auf diese Werte eingestellt, waren dafür mindestens 24 h nötig. Bei Verwendung von Ca(OH)₂ zur pH-Einstellung ergab sich bei pH 11 eine Inaktivierungszeit von mindestens 24 h, für pH 12 von mindestens 4 h.

Tabelle 11: pH-Sensitivität von VHS-Virus 1087 im Sandwichkeimträgertest (NaOH)

pH-Wert ¹	4 °C	10 °C	20 °C
10	n.d. ⁴	n.d.	n.i. ³
11	n.d.	n.i.	24 h ²
12	n.d.	n.i.	24 h

¹ pH-Werte wurden mit NaOH eingestellt

² Zeit, die benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Dieser Wert gilt entsprechend der Desinfektionsrichtlinien der DVG als ausreichend für einen Desinfektionserfolg.

³ n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nicht möglich

⁴ nicht durchgeführt

Tabelle 12: pH-Sensitivität von VHS-Virus 1087 im Sandwichkeimträger-test (Ca(OH)₂)

pH-Wert ¹	4 °C	10 °C	20 °C
10	n.i. ³	n.d. ⁴	n.i.
11	n.i.	n.d.	24 h ²
12	n.i.	n.d.	4 h

¹ pH-Werte wurden mit Ca(OH)₂ eingestellt

² Zeit, die benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Dieser Wert gilt entsprechend der Desinfektionsrichtlinien der DVG als ausreichend für einen Desinfektionserfolg.

³ n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nicht möglich

⁴ nicht durchgeführt

Für das HVAV 110 sind die Ergebnisse der pH-Sensitivität in den Tabellen 13-16 zusammengefasst.

Im Suspensionstest zeigte sich für das HVAV, dass eine Reduktion des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nur bei 3 pH-Werten möglich war, i.e. pH 3 (eingestellt mit HCl), pH 11 (eingestellt mit Ca(OH)₂) und pH 12 (eingestellt mit NaOH resp. Ca(OH)₂). Bei pH 3 dauerte es bei 4 °C mindestens 15 min, bei 10 °C mindestens 1 h und bei 20 °C waren es mindestens 30 min, die benötigt wurden, um den Titer um mindestens 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Stellt man den pH-Wert mittels Löschkalk auf pH 11 ein, so dauerte es bei 20 °C mindestens 15 min, um den Virustiter um mindestens 4 log₁₀-Stufen zu verringern. Bei 4 °C war diese Reduktion mit Ca(OH)₂ im Suspensionstest nicht möglich.

Bei einem pH-Wert in der Suspension von 12 wurde der Virustiter unabhängig von der Temperatur und der verwendeten Chemikalie um mindestens 4 log₁₀-Stufen reduziert. Mit NaOH dauerte dies im Minimum bei 4 °C 1 h, bei 10 °C 15 min und bei 20 °C 30 min. Verwendete man Ca(OH)₂ für die Einstellung des pH 12, dann benötigte man bei 4 °C bzw. 20 °C jeweils mindestens 15 min für die Inaktivierung.

Tabelle 13: pH-Sensitivität von HVAV 110 im Suspensionstest (HCl, NaOH)

pH-Wert ¹	4 °C	10 °C	20 °C
3	15 min ²	1 h	30 min
5	n.i. ³	n.i.	n.i.
7	n.i.	n.i.	n.i.
10	n.i.	n.i.	n.i.
11	n.i.	n.i.	n.i.
12	1 h	15 min	30 min

¹ pH-Werte wurden mit NaOH bzw. HCl eingestellt

² Zeit, die mindestens benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Dieser Wert gilt entsprechend der Desinfektionsrichtlinien der DVG im Suspensionstest als ausreichend für einen Desinfektionserfolg.

³ n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nicht möglich

Tabelle 14: pH-Sensitivität von HVAV 110 im Suspensionstest (Ca(OH)₂)

pH-Wert ¹	4 °C	10 °C	20 °C
10	n.i. ³	n.d. ⁴	n.i.
11	n.i.	n.d.	15 min ²
12	15 min	n.d.	15 min

¹ pH-Werte wurden mit Ca(OH)₂ eingestellt

² Zeit, die mindestens benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Dieser Wert gilt entsprechend der Desinfektionsrichtlinien der DVG im Suspensionstest als ausreichend für einen Desinfektionserfolg.

³ n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nicht möglich

⁴ nicht durchgeführt

In den Keimträgertests zeigte sich, dass bei Verwendung von NaOH zur Einstellung der pH-Werte eine log-Stufen-Reduktion des Virustiters um mindestens 4 Stufen sowohl bei pH 11 also auch bei pH 12 möglich war. Bei beiden pH-Werten war dies allerdings nur bei 20 °C und einer Mindesteinwirkzeit von 24 h möglich. Die Ergebnisse der Keimträgertest mit NaOH sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: pH-Sensitivität von HVAV 110 im Sandwichkeimträgertest (NaOH)

pH-Wert ¹	4 °C	10 °C	20 °C
10	n.i. ³	n.d. ⁴	n.i.
11	n.i.	n.d.	24 h ²
12	n.i.	n.d.	24 h

¹ pH-Werte wurden mit NaOH eingestellt

² Zeit, die mindestens benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Dieser Wert gilt entsprechend der Desinfektionsrichtlinien der DVG im als ausreichend für einen Desinfektionserfolg.

³ n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nicht möglich

⁴ nicht durchgeführt

Wurden die pH-Werte 10-12 dagegen mit Löschkalk eingestellt, konnte eine Reduktion des auf dem Keimträger vorhandenen Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nur bei pH 12, 20 °C und einer Einwirkzeit von mindestens 24 h beobachtet werden (Tabelle 16).

Tabelle 16: pH-Sensitivität von HVAV 110 im Sandwichkeimträgertest (Ca(OH)₂)

pH-Wert ¹	4 °C	10 °C	20 °C
10	n.i. ³	n.d. ⁴	n.i.
11	n.i.	n.d.	n.i.
12	n.i.	n.d.	24 h ²

¹ pH-Werte wurden mit Ca(OH)₂ eingestellt

² Zeit, die mindestens benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Dieser Wert gilt entsprechend der Desinfektionsrichtlinien der DVG im als ausreichend für einen Desinfektionserfolg.

³ n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nicht möglich

⁴ nicht durchgeführt

Die Untersuchungen zur pH-Sensitivität von KHV-T im Suspensionstest zeigten, dass dieses Virus eine sehr hohe Sensitivität gegenüber niedrigen pH-Werten hat. So wurde der Virustiter bei pH 3 innerhalb einer Minute um mindestens 4 log₁₀-Stufen reduziert (unabhängig von der Temperatur). Im Bereich zwischen pH 5 und pH 11 war der Virustiter sehr stabil und dieser konnte erst bei pH 12 wieder um mindestens 4 log₁₀-Stufen reduziert werden. Dies geschah wiederum in sehr kurzer Zeit (1 min) und temperaturunabhängig (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: pH-Sensitivität von KHV-T im Suspensionstest (NaOH)

pH-Wert ¹	4 °C	10 °C	20 °C
3	1 min ²	1 min	1 min
5	n.i. ³	n.d. ⁴	n.i.
7	n.i.	n.i.	n.i.
10	n.i.	n.i.	n.i.
11	n.i.	n.i.	n.i.
12	1 min	1 min	1 min

¹ pH-Werte wurden mit NaOH bzw. HCl eingestellt

² Zeit, die mindestens benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Dieser Wert gilt entsprechend der Desinfektionsrichtlinien der DVG im Suspensionstest als ausreichend für einen Desinfektionserfolg.

³ n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nicht möglich

⁴ nicht durchgeführt

Die Suspensionstests bei pH 10-pH 12 und Löschkalk wurden für das KHV-T nur bei 20 ° C durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass eine Mindestreduktion des Virustiters um 4 log₁₀-Stufen mit Löschkalk sowohl bei pH 11 als auch bei pH 12 möglich ist. Dafür ist eine Mindesteinwirkzeit von 1 min nötig (Tabelle 18).

Tabelle 18: pH-Sensitivität von KHV-T im Suspensionstest (Ca(OH)₂)

pH-Wert ¹	4 °C	10 °C	20 °C
10	n.d. ⁴	n.d.	n.i. ³
11	n.d.	n.d.	1 min ²
12	n.d.	n.d.	1 min

¹ pH-Werte wurden mit Ca(OH)₂ eingestellt

² Zeit, die mindestens benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Dieser Wert gilt entsprechend der Desinfektionsrichtlinien der DVG im Suspensionstest als ausreichend für einen Desinfektionserfolg.

³ n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nicht möglich

⁴ nicht durchgeführt

Die Ergebnisse der Keimträgertests unter Verwendung von NaOH zur pH-Einstellung sind in Tabelle 19 dargestellt. Der Virustiter des KHV-T konnte bei pH 10 und pH 11 nur bei 20 °C, bei einem pH-Wert von 12 dagegen bei 4 °C und 20 °C um mindestens 4 log₁₀-Stufen reduziert werden. Die Mindesteinwirkzeiten betragen dabei 24 h für pH 10 bei 20 °C, pH 11 bei 20 °C und pH 12 bei 4 °C. Bei pH 12 und 20 °C reichten mindestens 4 h für den gleichen Reduktionserfolg.

Tabelle 19: pH-Sensitivität von KHV-T im Sandwichkeimträgerest (NaOH)

pH-Wert ¹	4 °C	10 °C	20 °C
10	n.i. ³	n.d. ⁴	24 h ²
11	n.i.	n.d.	24 h
12	24 h	n.d.	4 h

¹ pH-Werte wurden mit NaOH eingestellt

² Zeit, die mindestens benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Dieser Wert gilt entsprechend der Desinfektionsrichtlinien der DVG im Suspensionstest als ausreichend für einen Desinfektionserfolg.

³ n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log-Stufen nicht möglich

⁴ nicht durchgeführt

In den Keimträgerests unter Verwendung von Ca(OH)₂ zur pH-Einstellung konnte der Virustiter nur bei 20 °C und einem pH-Wert von 12 mit einer Mindesteinwirkungszeit von 24 h um mindestens 4 log₁₀-Stufen reduziert werden (Tabelle 20).

Tabelle 20: pH-Sensitivität von KHV-T im Sandwichkeimträgerest (Ca(OH)₂)

pH-Wert ¹	4 °C	10 °C	20 °C
10	n.i. ³	n.d. ⁴	n.i.
11	n.i.	n.d.	n.i.
12	n.i.	n.d.	24 h ²

¹ pH-Werte wurden mit Ca(OH)₂ eingestellt

² Zeit, die mindestens benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren. Dieser Wert gilt entsprechend der Desinfektionsrichtlinien der DVG im Suspensionstest als ausreichend für einen Desinfektionserfolg.

³ n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log-Stufen nicht möglich

⁴ nicht durchgeführt

3.1.4 Untersuchung der Tenazität der Testviren in unterschiedlichen Teichmatrices (Wasser, Schlamm)

Zur Untersuchung der Überlebensfähigkeit der verschiedenen Fischviren in verschiedenen Teichmatrices wurde die Stabilität der Virusisolate (HVAV, KHV) im Labor in zwei verschiedenen Oberflächenwässern (Hohenheimer Eiszeitteich, Fischanlage im Landkreis Calw) und in einer Teichschlammprobe (Fischanlage im Landkreis Calw) untersucht.

Tenazität des HVA-Virus 110 im Oberflächenwasser

Das HVA-Virus 110 war im Oberflächenwasser des Eiszeitteiches bei 4 °C über 42 d (Dauer des Versuches) durch Virusanzüchtung nachweisbar. Dabei kam es über die Zeit des Versuches zu einer Reduktion des Virustiters ($\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$) von 5,67 auf 0,08. Eine Reduktion des Virustiters um mindestens 3 log-Stufen konnte bei 4 °C zum ersten Mal in der Probe, die nach 28 d untersucht wurde (Virustiter: 0,25), nachgewiesen werden. Bei 10 °C konnte das Virus nur bis Tag 14 angezüchtet werden (Virustiter: $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml} = 1,58$). In dieser Probe konnte im Versuchsverlauf erstmals eine Reduktion des Virustiters um mehr als 3 log-Stufen festgestellt werden. Wurden die Untersuchungen bei 20 °C durchgeführt, konnte das Virus nur bis zur Probe, die nach 1 d genommen wurde, re-isoliert werden. Zu diesem Zeitpunkt war der Virustiter um 1,63 log-Stufen reduziert. Basierend auf den Ergebnissen konnte über eine lineare Regressionsanalyse der sog. D90-Wert für die verschiedenen Temperaturbedingungen bestimmt werden. Unter dem D90-Wert versteht man die Zeit, die nötig ist, um den Virusausgangstiter um eine \log_{10} -Stufe (90%) zu reduzieren. Der D90-Wert dient dann als Basis für die Berechnung der Persistenz des Virus bei einer angenommenen Ausgangsvirusmenge in dem entsprechenden Habitat unter den vorgegebenen Umweltbedingungen. Für das HVAV 110 ergab sich für im Eiszeitwasser bei 4 °C ein D90-Wert von 6,68 d, bei 10 °C von 4,94 d und bei 20 °C von 2,51 d.

Im Oberflächenwasser der Fischanlage im Landkreis Calw war das HVAV 110 bei 4 °C über 42 d (Dauer des Versuches) durch Virusanzüchtung nachweisbar. Dabei kam es über die Zeit des Versuches zu einer Reduktion des Virustiters ($\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$) von 5,67 auf 1,25. Eine Reduktion des Virustiters um mindestens 3 log-Stufen konnte bei 4 °C zum ersten Mal in der Probe, die nach 28 d untersucht wurde, nachgewiesen werden. Bei 10 °C konnte das Virus ebenfalls über 42 d re-isoliert werden (Virustiter: 1,0). Eine Reduktion des Virustiters um 3 log-Stufen wurde nach 28 d beobachtet. Wurden die Labor-Stabilitätstests bei 20 °C durchgeführt, konnte das Virus nur bis zur Probe, die nach 1 d genommen wurde, re-isoliert werden. Zu diesem Zeitpunkt war der Virustiter um 1,21 log-Stufen reduziert. Für die Persistenz des Virus im Oberflächenwasser der Fischanlage im Landkreis Calw errechneten sich folgende D90-Werte: bei 4 °C $D90 = 9,63$ d, bei 10 °C $D90 = 9,34$ d und bei 20 °C $D90 = 4,8$ d.

Tenazität des KH-Virus T im Oberflächenwasser

Das KH-Virus war im Oberflächenwasser des Eiszeitteiches bei 4 °C über 28 d durch Virusanzüchtung nachweisbar (Virustiter: 0,67). Eine Reduktion des Virustiters um

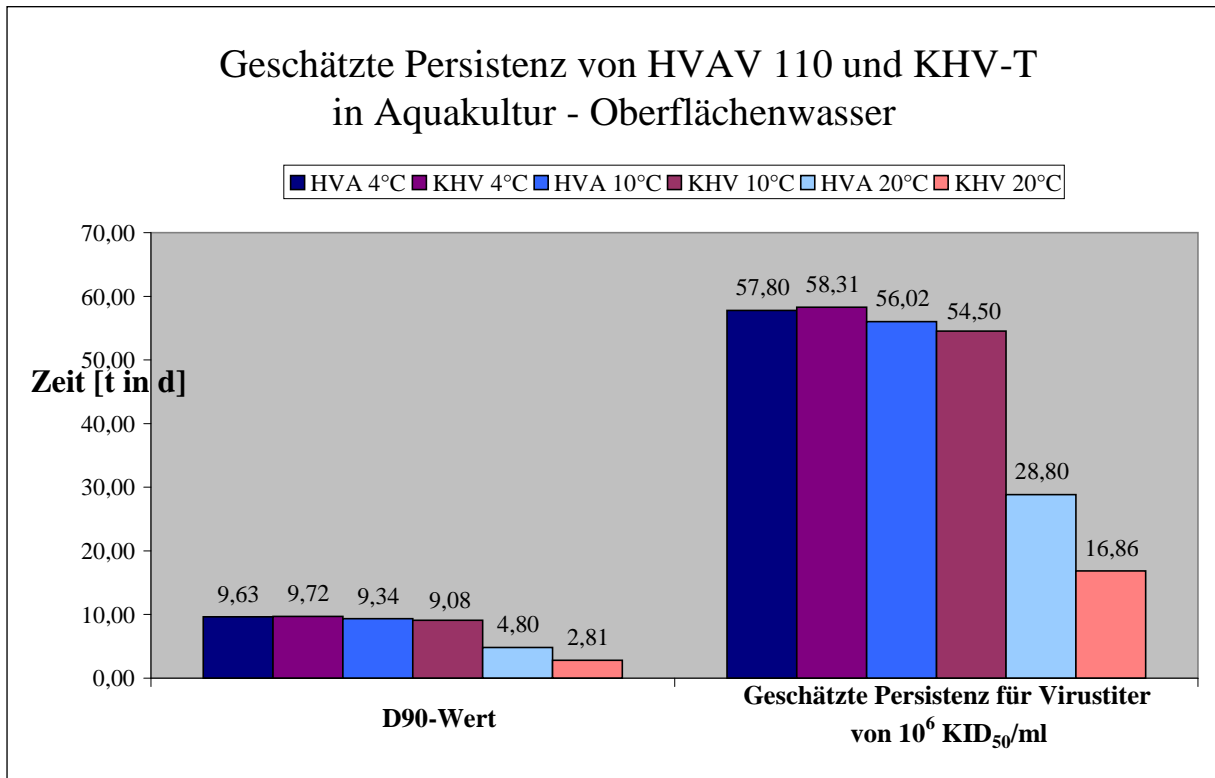
mindestens 3 log-Stufen konnte bei 4 °C zum ersten Mal in der Probe, die nach 14 d untersucht wurde (Virustiter: 1,58, Ausgangsvirustiter: 4.67), nachgewiesen werden. Bei 10 °C konnte das Virus nur bis Tag 1 angezüchtet werden (Virustiter: 4,58). Wurden die Untersuchungen bei 20 °C durchgeführt, konnte das Virus ebenfalls nur bis zur Probe, die nach 1 d genommen wurde, re-isoliert werden. Zu diesem Zeitpunkt war der Virustiter um 1,00 log-Stufen reduziert. Die D90-Werte betragen bei 4 °C 9,42 d, bei 10 °C 2,69 d und bei 20 °C 2,73 d.

Im Oberflächenwasser der Fischanlage im Landkreis Calw war das KHV-T bei 4 °C über 28 d durch Virusanzüchtung nachweisbar. Eine Reduktion des Virustiters um mindestens 3 log-Stufen konnte bei 4 °C zum ersten Mal in der Probe, die nach 28 d untersucht wurde (Virustiter: 1,17, Ausgangsvirustiter: 4.67), nachgewiesen werden. Bei 10 °C konnte das Virus über 42 d (Dauer des Versuches) re-isoliert werden (Virustiter: 0,58). Eine Reduktion des Virustiters um 3 log₁₀-Stufen wurde nach 14 d beobachtet.

Wurden die Labor-Stabilitätstests bei 20 °C durchgeführt, konnte das Virus nur bis zur Probe, die nach 1 d genommen wurde, re-isoliert werden. Zu diesem Zeitpunkt war der Virustiter um 1,34 log-Stufen reduziert. Die D90-Werte betragen bei 4 °C 9,72 d, bei 10 °C 9,08 d und bei 20 °C 2,81 d.

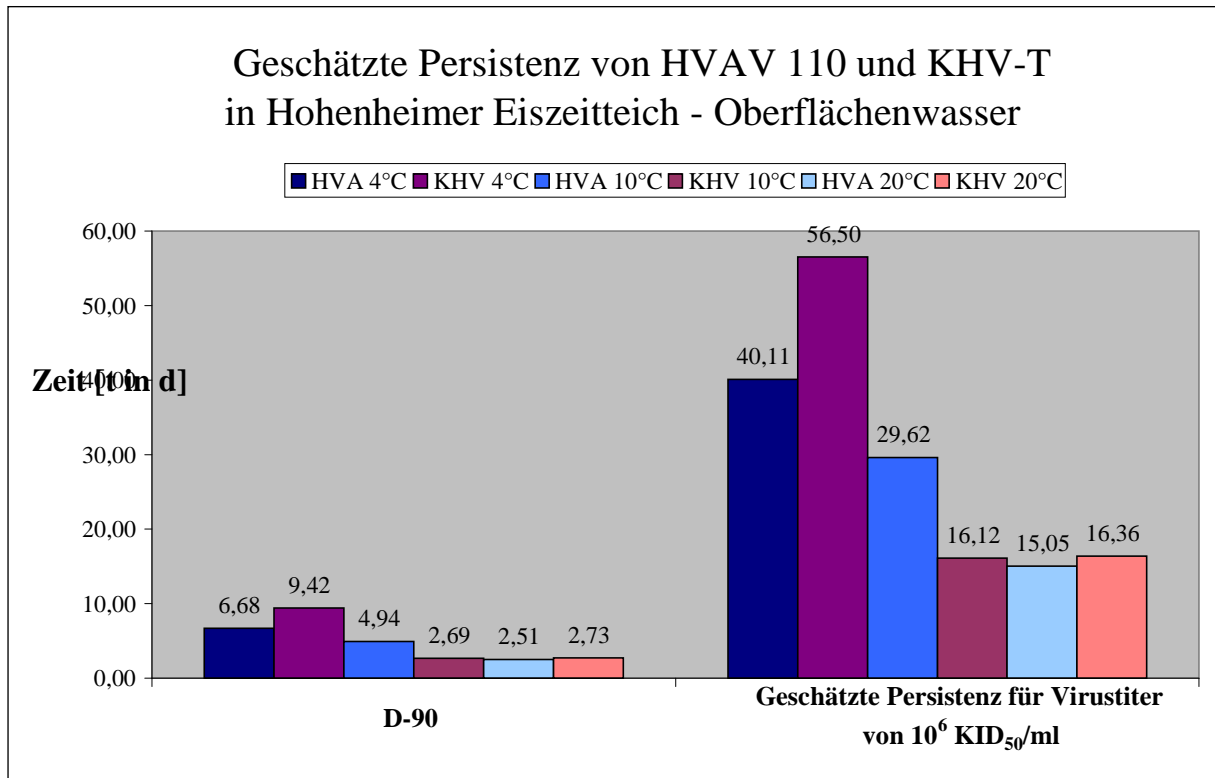
D90-Werte und die davon abgeleitete geschätzte Persistenz des Virus im Oberflächenwasser bei einem angenommenen Virusausgangstiter von 10⁶ KID₅₀/ml sind für HVAV 110 und KHV-T in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt.

Abbildung 2: Persistenz von HVAV 110 und KHV-T im Aquakultur-Oberflächenwasser (Landkreis Calw) bei 4 °C, 10 °C und 20 °C



D90 = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine log₁₀-Stufe = 90 % der Virusbelastung

Abbildung 3: Persistenz von HVAV 110 und KHV-T im Eiszeiteichwasser bei 4 °C, 10 °C und 20 °C



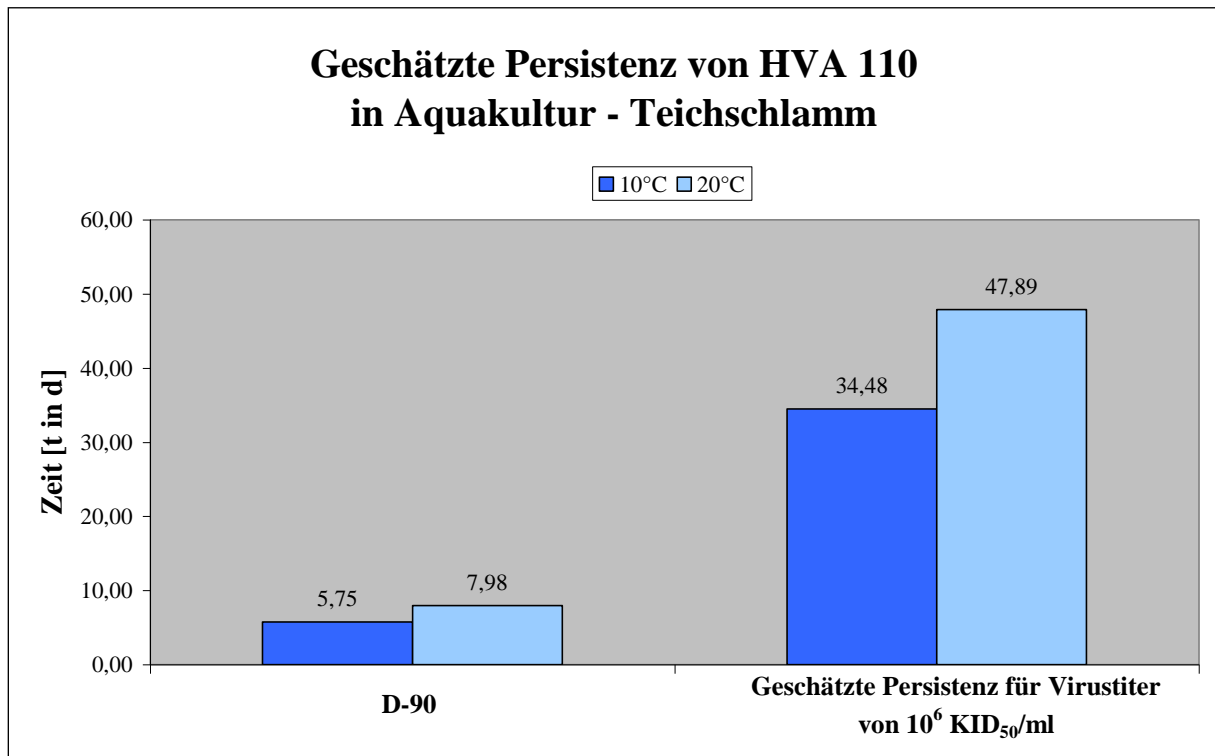
D90 = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine log₁₀-Stufe = 90 % der Virusbelastung

Tenazität des HVA-Virus im Teichschlamm

Unter Verwendung von Teichschlamm aus einer naturnahen Aquakulturanlage im Landkreis Calw konnte das Virus bei 10 °C über 42 d nachgewiesen werden. Der Virustiter reduzierte sich dabei um mehr als 5 log₁₀-Stufen. Bei 20 °C wurde das Virus bis zum Tag 14 re-isoliert (Virustiter log₁₀KID₅₀/ml = 1,83). Ab Untersuchungstag 28 konnte HVA-Virus in der Virustitration nicht mehr nachgewiesen werden. Reduktionen des Virustiters um 3 log-Stufen konnten sowohl bei 10 °C als auch bei 20 °C ab Tag 28 nachgewiesen werden. Die berechneten D90-Werte betragen bei 10 °C 5,75 d und bei 20 °C 7,98 d.

D90-Werte und die davon abgeleitete geschätzte Persistenz des Virus im Teichschlamm bei einem angenommenen Virusausgangstiter von 10⁶ KID₅₀/ml sind für HVAV 110 in Abbildung 4 dargestellt.

Abbildung 4: Persistenz von HVA 110 im Aquakultur-Teichschlamm bei 10 °C und 20 °C



D90 = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine \log_{10} -Stufe = 90 % der Virusbelastung

3.1.5 Durchführung der Desinfektionsmittelprüfungen mit den Testviren

Gemäß den Prüfrichtlinien des Desinfektionsmittelausschusses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) besteht die Prüfung von Desinfektionsmitteln (DM) auf ihre viruzide Wirkung aus folgenden Phasen:

1. Vorprüfung

- Prüfung der Zytotoxizität der zu testenden DM
- Prüfung der Empfänglichkeit der Zellen gegenüber einer Virusinfektion nach Vorbehandlung der Zellen mit den entsprechenden DM (Interferenztest)
- Überprüfung der viruziden Wirkung der DM auf die Testviren im sog. Suspensionstest

2. Hauptprüfung

- Überprüfung der viruziden Wirkung der DM auf die Testviren im sog. Keimträgertest

3.1.5.1 Zytotoxizitätstests

Im ersten Schritt der Desinfektionsmittelprüfung wurde zunächst überprüft, ob die zu testenden DM auf die verwendeten Zell-Linien einen toxischen Effekt ausüben. Dazu wurden die DM auf die Gebrauchskonzentrationen eingestellt und anschließend eine dekadische Verdünnungsreihe der DM hergestellt und auf die Zellkulturen aufgetragen. In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests aufgezeigt. Die erhaltenen Daten zeigen bei welcher \log_{10} -Verdünnungsstufe desinfektionsmittelbedingte zelltoxische Effekte auf die Zell-Linien auftraten.

Tabelle 21: Ergebnisse der Zytotoxizitätstests für die Zell-Linien EK-1, CCB und RTG 2/f

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Zell-Linien		
		EK-1 \log_{10} -Stufe ¹	CCB \log_{10} -Stufe	RTG 2/f \log_{10} -Stufe
Ameisensäure	0,1	1	0	n.d. ²
	0,25	1	0	n.d.
	0,5	1	0	0-1
	1	2	n.d.	0-1
Formalin	1	3	3	2
	3	4	4	2
Didecyldimethylammoniumchlorid	0,025	2	1	n.d.
	0,05	2	2	n.d.
	0,1	1	2	2
	0,25	n.d.	n.d.	3
Povidon-Iod	75 ppm	n.d.	0	0
	0,1	n.d.	0	0
	0,25	0	0	0
	0,5	0	0	0
	1	1	n.d.	n.d.
Kalkmilch pH 12	--- ³	0	0	0
Peressigsäure	0,01	0	1	n.d.
	0,025	0	1	0-1
	0,05	0	2	1
	0,1	1	n.d.	2

¹ höchste Verdünnungsstufe des DM, die einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausübt.

² nicht durchgeführt

³ nicht spezifiziert

3.1.5.2 Interferenztests

Mit dem anschließenden Interferenzttest wurde überprüft, ob die Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Desinfektionsmitteln in unterschiedlichen Konzentrationen einen Einfluss auf die Suszeptibilität der Zellen gegenüber einer Infektion mit den drei Testviren hat. Wie aus Tabelle 22 hervorgeht, wurde ein Einfluss der Desinfektionsmittel auf die Suszeptibilität der Zellen nicht festgestellt.

Tabelle 22: Ergebnisse des Interferenzttests der Viren VHSV 1087, HVAV 110 und KHV-T

		Virus		
		HVAV 110 Virustiter (log ₁₀) ¹	KHV-T Virustiter (log ₁₀)	VHSV 1087 Virustiter (log ₁₀)
Viruskontrolle ohne DM		8,00	7,75	6,75
Desinfektionsmittel	Konzentration (%)			
Ameisensäure	0,1	7,50	7,75	n.d. ²
	0,25	7,50	7,75	n.d.
	0,5	8,25	7,75	7,00
	1	7,75	n.d.	6,75
Formalin	1	7,50	7,50	8,50
	3	8,25	7,75	8,50
Didecyldimethyl- Ammoniumchlorid	0,025	8,25	8,25	n.d.
	0,05	8,25	8,25	n.d.
	0,1	8,00	7,50	7,00
	0,25	n.d.	n.d.	6,75
Povidon-Iod	75 ppm	n.d.	7,50	n.d.
	0,1	n.d.	7,25	7,00
	0,25	8,75	7,75	6,25
	0,5	9,00	7,75	6,75
	1	7,75	n.d.	n.d.
Kalkmilch	--- ³	9,00	7,25	6,75
Peressigsäure	0,01	8,25	7,25	n.d.
	0,025	8,25	8,00	6,50
	0,05	8,50	7,50	6,50
	0,1	8,50	n.d.	6,25

¹ Virustiter der Viren nach Rücktitration mit und ohne DM-Behandlung der Zellen

² nicht durchgeführt

³ nicht spezifiziert

3.1.5.3 Suspensionstests

Zur Testung der Empfindlichkeit von VHSV 1087, HAV 110 und KHV-T gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln wurde im nächsten Schritt der sog. Vorprüfung entsprechend den Prüfrichtlinien des Desinfektionsmittelausschusses der DVG der sog. Suspensionstest durchgeführt. Dabei wurden die Testviren gegen insgesamt sechs verschiedene als Desinfektionsmittel verwendete Wirkstoffe in verschiedene Konzentrationen unter drei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 10 °C, 20 °C) und vier verschiedenen Einwirkzeiten (15 min, 30 min, 60 min, 120 min) getestet. Als Belastungssubstanz diente fötales Kälberserum (FKS). Im Suspensionstest nach DVG gilt eine Reduktion des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen als indikativ für eine erfolgreiche Desinfektion mit den verwendeten DM in der entsprechenden Konzentration, der Einwirkzeit und den Temperaturbedingungen.

VHS-Virus 1087

Auf der Basis der Vorgaben der Wirksamkeitsprüfung im Suspensionstest der DVG konnte für das VHSV 1087 eine 4 log₁₀-Stufen-Reduktion nur mit 3 %-igem Formalin bei 20 °C und einer Einwirkzeit von 60 min erreicht werden. Deshalb wurde zusätzlich ausgewertet, unter welchen Testbedingungen im Labor eine Reduktion der Virusausgangsmenge (KID₅₀ pro ml) um mindestens drei log₁₀-Stufen zu erreichen ist. Die Ergebnisse dieser Analysen sind für das VHSV 1087 in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Desinfektionsmittelprüfung, VHS-Virus 1087 im Suspensionstest

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Temperatur		
		4 °C	10 °C	20 °C
Ameisensäure	0,5	n.i. ²	120 min ¹	n.i.
	1	60 min	n.i.	n.i.
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid	0,10	120 min	60 min	n.i.
	0,25	n.i.	n.i.	15 min
Formalin	1	n.i.	n.i.	n.i.
	3	n.i.	n.i.	30 min
Kalkmilch pH 12	--- ³	n.i.	120 min	120 min
Povidon-Iod	0,10	n.d. ⁴	15 min	n.i.
	0,25	n.d.	n.d.	15 min
Peressigsäure	0,025	n.i.	15 min	n.i.
	0,05	120 min	15 min	n.i.

¹ Mindestzeit, die benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 3 log₁₀-Stufen zu reduzieren.

² n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit (120 min) ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 3 log₁₀-Stufen nicht möglich

³ nicht spezifiziert

⁴ nicht durchgeführt

KH-Virus T

Auf der Basis der Vorgaben der Wirksamkeitsprüfung im Suspensionstest der DVG konnte für das KHV-T eine 4 log₁₀-Stufen-Reduktion mit 0,05 %-igem Didecyldimethylammoniumchlorid bei 10 °C und einer Mindesteinwirkzeit von 15 min und mit Kalkmilch pH 12 bei 10 °C und einer Mindesteinwirkzeit von 30 min erreicht werden. Zusätzlich dazu wurde auch für das KHV-T ausgewertet, unter welchen Testbedingungen im Labor eine Reduktion der Virusausgangsmenge (KID₅₀ pro ml) um mindestens drei log₁₀-Stufen zu erreichen ist.

Die Ergebnisse dieser Analysen sind für das KHV-T in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Desinfektionsmittelprüfung, KHV-T im Suspensionstest

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Temperatur		
		4 °C	10 °C	20 °C
Ameisensäure	0,5	60 min ¹	n.i. ²	60 min
	1	n.i.	n.i.	15 min
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid	0,025	120 min	60 min	n.i.
	0,05	15 min	15 min	15 min
Formalin	1	n.i.	n.i.	n.i.
	3	n.i.	n.i.	n.i.
Kalkmilch pH 12	--- ³	15 min	15 min	15 min
Povidon-Iod	0,10	n.i.	n.i.	n.i.
	0,25	15 min	15 min	15 min
Peressigsäure	0,025	n.i.	n.i.	n.i.
	0,05	n.i.	n.i.	15 min

¹ Mindestzeit, die benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 3 log₁₀-Stufen zu reduzieren.

² n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit (120 min) ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 3 log₁₀-Stufen nicht möglich

³ nicht spezifiziert

HVA-Virus 110

Das HVAV 110 zeigte im Suspensionstest im Gegensatz zu den beiden anderen Testviren eine höhere Empfindlichkeit gegenüber den meisten DM. Eine Zusammenfassung der Testbedingungen, mit denen eine 4 log₁₀-Stufen-Reduktion erreicht werden konnte, ist in Tabelle 25 dargestellt. Zusätzlich zeigt die Tabelle 26 auch für das HVAV 110 diejenigen Testbedingungen, die im Labor eine Reduktion der Virusausgangsmenge (KID₅₀ pro ml) um mindestens drei log₁₀-Stufen bewirken.

Tabelle25: Desinfektionsmittelprüfung, HVAV im Suspensionstest (DVG-Vorgaben)

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Temperatur		
		4 °C	10 °C	20 °C
Ameisensäure	0,1	n.i. ²	n.i. ²	n.i. ²
	0,25	15 min ¹	15 min	15 min
	0,5	15 min	15 min	15 min
	1	15 min	n.i.	15 min
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid	0,025	n.i.	n.i.	30 min
	0,05	n.i.	15 min	15 min
	0,10	n.i.	n.i.	n.i.
Formalin	1	n.i.	n.i.	n.i.
	3	30 min	n.i.	n.i.
Kalkmilch pH 12	--- ³	15 min	15 min	15 min
Povidon-Iod	0,25	n.i.	n.d. ⁴	30 min
	0,50	n.i.	n.d.	30 min
Peressigsäure	0,01	n.i.	n.i.	n.i.
	0,025	n.i.	15 min	15 min
	0,05	15 min	15 min	15 min
	0,1	15 min	15 min	15 min

¹ Mindestzeit, die benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 4 log₁₀-Stufen zu reduzieren.

² n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit (120 min) ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 4 log₁₀-Stufen nicht möglich

³ nicht spezifiziert

⁴ nicht durchgeführt

Tabelle 26: Desinfektionsmittelprüfung, HVAV im Suspensionstest

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Temperatur		
		4 °C	10 °C	20 °C
Ameisensäure	0,1	n.i. ²	n.i. ²	n.i. ²
	0,25	15 min ¹	15 min	15 min
	0,5	15 min	15 min	15 min
	1	15 min	15 min	15 min
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid	0,025	120 min	15 min	15 min
	0,05	15 min	15 min	15 min
	0,10	15 min	15 min	15 min
Formalin	1	60 min	120 min	30 min
	3	30 min	15 min	15 min
Kalkmilch pH 12	--- ³	15 min	15 min	15 min
Povidon-Iod	0,25	15 min	n.d. ⁴	15 min
	0,50	15 min	n.d.	15 min
Peressigsäure	0,01	60 min	n.i.	n.i.
	0,025	n.i.	15 min	15 min
	0,05	15 min	15 min	15 min
	0,1	15 min	15 min	15 min

¹ Mindestzeit, die benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 3 log₁₀-Stufen zu reduzieren.

² n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit (120 min) ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 3 log₁₀-Stufen nicht möglich

³ nicht spezifiziert

⁴ nicht durchgeführt

3.1.5.4 Keimträgertests

Im nächsten Schritt wurde die Empfindlichkeit des VHSV 1087, HVAV 110 und KHV-T gegenüber den verschiedenen Desinfektionsmitteln entsprechend der Prüfrichtlinien des Desinfektionsmittelausschusses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) in der sog. Hauptprüfung im sog. Keimträgertest überprüft. Diese Hauptprüfung wurde mit Sandwichkeimträgern durchgeführt und diente der Testung der viruziden Wirkung der DM auf die Testviren unter praxisähnlichen Bedingungen, i.e. auf an eine Oberfläche gebundene Viren. Die verwendeten Desinfektionsmittelkonzentrationen orientierten sich dabei an den Ergebnissen der Suspensionstests der Vorprüfung. Im Keimträgertest nach DVG gilt ein DM als wirksam, wenn bei der Rücktitration der desinfizierten Viren das Virus nicht mehr nachweisbar ist, also der Virusausgangstiter ($\geq 10^4$ KID₅₀/ml) bis unterhalb der Nachweisgrenze reduziert ist. Daneben wurden auch im Keimträgertest die Testbedingungen im Labor bestimmt, die zu einer Reduktion der Virusausgangsmenge (KID₅₀ pro ml) um mindestens drei log-Stufen führten.

VHS-Virus 1087

Auf der der Vorgaben der Wirksamkeitsprüfung im Keimträgertest der DVG konnten für VHSV 1087 folgende Ergebnisse gefunden werden: Ameisensäure in einer Konzentration von 0,5 % ist bei einer Temperatur von 4 °C bzw. 10 °C und einer Mindesteinwirkzeit von 2 h gegen VHSV 1087 wirksam. Verwendet man die gleiche Konzentration der Ameisensäure bei 20 °C, so reichen für eine wirksame Desinfektion im Keimträgertest bereits 15 min aus. Bei einer Konzentrationserhöhung auf 1 % ist die Ameisensäure bei allen 3 Testtemperaturen mit einer Mindesteinwirkzeit von 15 min wirksam. Formalin (1 %) inaktiviert das Testvirus bei 4 °C und 20 °C innerhalb von 15 min, bei 10 °C innerhalb von 30 min. Verwendet man Didecyldimethylammoniumchlorid (0,25 %), so ist eine erfolgreiche Desinfektion bei 4 °C und 10 °C bei einer Mindesteinwirkzeit von 2 h möglich. Bei 20 °C ist dieses DM im Keimträgertest unwirksam. Dies gilt für die Kalkmilch pH 12 und das 0,25 %-ige Povidon-Jod für alle Temperaturbereiche. Bei Verwendung der Peressigsäure (0,05 %) wird eine Desinfektionswirkung nach 15 min Einwirkzeit bei 4 °C und 20 °C erreicht. Die Ergebnisse der Hauptprüfung sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Hauptprüfung von VHSV 1087 im Sandwichkeimträgertest

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Testtemperaturen	Titer der Viruskontrolle $\log_{10}KID_{50}/ml$	Nachweis von Restvirus auf dem Keimträger nach unterschiedlichen Einwirkzeiten in min			
				15	30	60	120
Ameisensäure	0,5	4 °C	4,88±0,43 ¹	+ ²	+	+	- ³
		10 °C	5,00±0,35	+	+	+	-
		20 °C	4,63±0,32	-	-	-	-
	1,0	4 °C	4,88±0,43	-	-	-	-
		10 °C	4,63±0,25	-	-	-	-
		20 °C	4,44±0,77	-	-	-	-
Formalin	1	4 °C	3,69±0,47	-	-	-	-
		10 °C	4,44±0,52	+	-	-	-
		20 °C	3,69±0,13	-	-	-	-
Didecyldimethylammoniumchlorid	0,25	4 °C	4,44±0,31	+	+	+	-
		10 °C	4,88±0,25	+	+	+	-
		20 °C	4,81±0,47	+	+	+	+
Kalkmilch pH 12	--- ⁴	4 °C	4,19±0,55	+	+	+	+
		10 °C	4,88±0,25	+	+	+	+
		20 °C	4,38±0,60	+	+	+	+
Povidon-Iod	0,25	4 °C	4,25±0,65	+	+	+	-
		10 °C	4,75±0,20	+	+	+	-
		20 °C	4,88±0,25	+	+	+	-
Peressigsäure	0,05	4 °C	4,50±0,41	-	-	-	-
		10 °C	n.d. ⁵	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		20 °C	4,56±0,31	-	-	-	-

¹ Der Virustiter ist als Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen ± Standardabweichung dargestellt.

² Restvirus nachweisbar

³ Restvirus nicht nachweisbar

⁴ nicht spezifiziert

⁵ nicht durchgeführt

Die Testbedingungen für eine drei \log_{10} -Stufen-Reduktion des VHSV 1087 im Keimträgertest sind in Tabelle 28 zusammengestellt.

Tabelle 28: Desinfektionsmittelprüfung, VHSV 1087 im Keimträgertest

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Temperatur		
		4 °C	10 °C	20 °C
Ameisensäure	0,5	15 min ¹	15 min	15 min
	1	15 min	15 min	15 min
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid	0,25	n.i. ²	15 min	n.i.
Formalin	1	n.i.	n.i.	n.i.
Kalkmilch pH 12	--- ³	n.i.	n.i.	n.i.
Povidon-Iod	0,25	120 min	120 min	120 min
Peressigsäure	0,05	15 min	n.d. ⁴	15 min

¹ Mindestzeit, die benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 3 log₁₀-Stufen zu reduzieren.

² n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit (120 min) ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 3 log₁₀-Stufen nicht möglich

³ nicht spezifiziert

⁴ nicht durchgeführt

KH-Virus T

Ameisensäure wirkt in einer Konzentration von 0,25 % bei einer Temperatur von 4 °C und einer Mindesteinwirkzeit von 60 min bzw. bei 10 °C und 20 °C mit einer Mindesteinwirkzeit von 30 min gegen KHV-T. Bei einer Konzentrationserhöhung auf 1 % ist die Ameisensäure bei 4 °C und 10 °C mit einer Mindesteinwirkzeit von 15 min wirksam, bei 20 °C erst ab 30 min. Formalin (1 %) inaktiviert das Testvirus bei 10 °C und 20 °C innerhalb von 2 h, bei 4 °C dagegen nicht. Eine 3 %-ige Formalinlösung dagegen ist gegen KHV bei allen Temperaturen im Keimträgertest unwirksam. Dies lässt sich aber mit der höheren Zytotoxizität und der damit erhöhten Nachweisgrenze erklären. Verwendet man Didecyldimethylammoniumchlorid (0,05 %), so ist eine erfolgreiche Desinfektion nur bei 10 °C und 20 °C bei einer Mindesteinwirkzeit von 2 h bzw. 1 h möglich. Bei 4 °C ist dieses DM im Keimträgertest in dieser Konzentration unwirksam. Dies gilt bei 4 °C auch für die erhöhte Konzentration von 0,1 %. Diese Konzentration des DM reduziert aber bei 10 °C mit einer Mindesteinwirkzeit von 30 min den Virustiter bis unter die Nachweisgrenze.

Kalkmilch pH 12, das 0,25 %-ige Povidon-Iod sowie Peressigsäure in einer 0,25 %-igen Lösung sind für alle Temperaturbereiche im Keimträgertest unwirksam gegenüber KHV-T. Bei Verwendung der Peressigsäure in einer 0,05 %-igen Lösung wird eine Desinfektionswirkung nach 30 min Einwirkzeit bei 10 °C erreicht. Die Ergebnisse der Hauptprüfung sind für das KHV-T in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Hauptprüfung von KHV-T im Sandwichkeimträgertest

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Testtemperaturen	Titer der Viruskontrolle $\log_{10}KID_{50}/ml$	Nachweis von Restvirus auf dem Keimträger nach unterschiedlichen Einwirkzeiten in min			
				15	30	60	120
Ameisensäure	0,25	4 °C	4,38±0,60 ¹	+ ²	+	- ³	-
		10 °C	5,19±0,31	+	-	-	-
		20 °C	5,00±0,00	+	-	-	-
	0,5	4 °C	4,75±0,54	-	-	-	-
		10 °C	5,50±0,54	-	-	-	-
		20 °C	4,86±0,32	+	-	-	-
Formalin	1	4 °C	4,44±0,31	+	+	+	+
		10 °C	5,19±0,38	+	+	+	-
		20 °C	4,94±0,24	+	+	+	-
	3	4 °C	5,19±0,43	+	+	+	+
		10 °C	5,00±0,29	+	+	+	+
		20 °C	4,69±0,75	+	+	+	+
Didecyldimethylammoniumchlorid	0,05	4 °C	4,75±0,35	+	+	+	+
		10 °C	5,00±0,35	+	+	+	-
		20 °C	5,13±0,25	+	+	-	-
	0,1	4 °C	4,56±0,52	+	+	+	+
		10 °C	5,13±0,25	+	-	-	-
		20 °C	n.d. ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kalkmilch pH 12	--- ⁵	4 °C	4,63±0,43	+	+	+	+
		10 °C	5,13±0,25	+	+	+	+
		20 °C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Povidon-Iod	0,25	4 °C	4,69±0,13	+	+	+	+
		10 °C	4,50±0,00	+	+	+	+
		20 °C	5,31±0,52	+	+	+	+
Peressigsäure	0,025	4 °C	4,44±0,38	+	+	+	+
		10 °C	4,44±0,13	+	+	+	+
		20 °C	4,69±0,75	+	+	+	+
	0,05	4 °C	4,88±0,43	+	+	+	+
		10 °C	5,19±0,31	+	-	-	-
		20 °C	4,38±0,43	+	+	+	+

¹ Der Virustiter ist als Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen ± Standardabweichung dargestellt.

² Restvirus nachweisbar

³ Restvirus nicht nachweisbar

⁴ nicht durchgeführt

⁵ nicht spezifiziert

Die Testbedingungen für eine 3 \log_{10} -Stufen-Reduktion des KHV-T im Keimträgertest sind in Tabelle 30 zusammengestellt.

Tabelle 30: Desinfektionsmittelprüfung, KHV-T im Keimträgertest

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Temperatur		
		4 °C	10 °C	20 °C
Ameisensäure	0,25	n.i. ²	30 min ¹	15 min
	0,5	15 min	15 min	30 min
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid	0,05	n.i.	60 min	60 min
	0,1	n.i.	15 min	n.d. ⁴
Formalin	1	n.i.	n.i.	n.i.
	3	n.i.	n.i.	n.i.
Kalkmilch pH 12	--- ³	n.i.	n.i.	n.i.
Povidon-Iod	0,25	120 min	n.i.	120 min
Peressigsäure	0,025	n.i.	n.i.	n.i.
	0,05	n.i.	30 min	n.i.

¹ Mindestzeit, die benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 3 log₁₀-Stufen zu reduzieren.

² n.i. = unter den Testbedingungen und der vorgegebenen Maximalzeit (120 min) ist eine Reduzierung des Virustiters um mindestens 3 log₁₀-Stufen nicht möglich

³ nicht spezifiziert

⁴ nicht durchgeführt

HVA-Virus 110

Für das HVAV 110 wurden Keimträgertests nur mit Ameisensäure, Formalin und Peressigsäure durchgeführt. Die Ameisensäure (0,1 %) inaktivierte das Virus bei 4 °C nach mindestens 30 min unter die Nachweisgrenze des Testsystems. Wie bereits beim KHV-T beobachtet, war das Formalin in beiden Konzentrationen (1 %, 3 %) bei 20 °C gegenüber dem HVAV 110 unwirksam. Die 0,025 %-ige Peressigsäure zeigte im Keimträgertest bei einer Temperatur von 20 °C und einer Mindesteinwirkzeit von 60 min eine desinfizierende Wirkung auf das HVAV 110. Dies war bei der gleichen Konzentration aber einer Testtemperatur von 4 °C nicht der Fall. Die Ergebnisse der Hauptprüfung sind für das HVAV 110 in Tabelle 31 zusammengefasst.

Tabelle 31: Hauptprüfung von HVAV 110 im Sandwichkeimträgertest

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Testtemperaturen	Titer der Viruskontrolle $\log_{10}KID_{50}/ml$	Nachweis von Restvirus auf dem Keimträger nach unterschiedlichen Einwirkzeiten in min			
				15	30	60	120
Ameisensäure	0,10	4 °C	4,38±0,60 ¹	+ ²	+	- ³	-
		10 °C	n.d. ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		20 °C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formalin	1	4 °C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		10 °C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		20 °C	6,63±0,32	+	+	+	+
	3	4 °C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		10 °C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		20 °C	6,75±0,46	+	+	+	+
Peressigsäure	0,025	4 °C	6,00±0,35	+	+	+	+
		10 °C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		20 °C	6,69±0,47	+	+	-	-

¹ Der Virustiter ist als Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen ± Standardabweichung dargestellt.

² Restvirus nachweisbar

³ Restvirus nicht nachweisbar

⁴ nicht durchgeführt

Die Testbedingungen für eine 3 \log_{10} -Stufen-Reduktion des HVAV im Keimträgertest sind in Tabelle 32 zusammengestellt.

Tabelle 32: Desinfektionsmittelprüfung, HVAV 110 im Keimträgertest

Desinfektionsmittel	Konzentration %	Temperatur		
		4 °C	10 °C	20 °C
Ameisensäure	0,10	30 min ¹	n.d. ³	n.d.
Formalin	1	n.d.	n.d.	60 min
	3	n.d.	n.d.	15 min
Peressigsäure	0,025	15 min	n.d.	15 min

¹ Mindestzeit, die benötigt wird, um unter den Testbedingungen den Virustiter um mind. 3 \log_{10} -Stufen zu reduzieren.

² nicht durchgeführt

3.1.6 Feststellung der Resistenz der Viren gegen Trocknung

Zur Feststellung der Empfindlichkeit der verschiedenen Testviren gegenüber Trocknung, aber auch zur Untersuchung der Eignung der verschiedenen verwendeten Methoden und Materialien zur Herstellung der Keimträger für die Desinfektionsmittelprüfung, wurden VHSV 1087, HVAV 110 und KHV-T auf Holz- und Metallkeimträger sowie auf die

Sandwichkeimträger-Filter (Zeta Plus Virosorb 1MDS-Filter) aufgebracht und die Inaktivierung der Viren durch die Antrocknung untersucht.

Wie die Ergebnisse für HVAV 110 (siehe Tabelle 33) zeigen, ist die nach DVG vorgeschriebene Verwendung von Holzkeimträgern in der Desinfektionsmittelhauptprüfung nicht möglich, da bereits nur durch die Trocknung der Keimträger ein Titerverlust von 3 \log_{10} -Stufen innerhalb von 60 min auftritt. Bei der Verwendung von Metallkeimträgern (mit Proteinbelastung) findet eine Titerreduktion von 3 \log_{10} -Stufen bereits innerhalb von 30 min statt. Durch diesen Titerverlust von 3 \log_{10} -Stufen während der Trocknung der Keimträger würde zum einen die geforderte Reduktion des Virustiters von 4 \log_{10} -Stufen durch die Desinfektionsmittel kaum erreicht werden und zum anderen wäre ein Einfluss auf die Wirkung der Desinfektionsmittel nicht auszuschließen.

Das KHV-T schien auf die Trocknung auf Metallkeimträger und Zeta Plus Virosorb 1MDS-Filter sehr ähnlich zu reagieren. Allerdings war das KHV-T auf Holzkeimträgern deutlich resistenter gegenüber der Trocknung als das HVAV 110 und verhielt sich bei Vergleich der 45 min-Werte ähnlich wie das VHSV 1087.

Allgemein zeigte sich, dass das VHSV 1087 deutlich resistenter gegenüber der Trocknung auf allen drei Keimträgerarten war als die beiden Herpesviren (HVAV 110, KHV-T). Bei VHSV 1087 gab es innerhalb der Trocknungszeit von 45 min bei den Metallkeimträgern eine vernachlässigbare Titerreduktion von 0,43 \log_{10} -Stufen.

Die Verwendung der Holzkeimträger bei der Desinfektionsmittelprüfung wäre bei KHV-T und VHSV 1087 möglich gewesen, da die Titerreduktion nach 45 min bei VHSV 1087 1,62 \log_{10} KID₅₀/ml betrug, wobei immer noch ein ausreichender Titer für eine Reduktion vom min. 4 \log_{10} -Stufen vorhanden wäre, bzw. sogar nur 0,25 \log_{10} KID₅₀/ml bei KHV-T.

Trotzdem wurde zur Erreichung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Wirkungstestung der Desinfektionsmittel zwischen den verschiedenen Viren als Alternative zu den herkömmlichen und von der Prüfrichtlinie der DVG vorgegebenen Holz- bzw. Metallkeimträgern die sog. Sandwichkeimträgermethode für die Hauptprüfung in der Desinfektionsmittelprüfung verwendet. Diese Methode ist zwar zeit- und kostenaufwändiger, machte es aber möglich, die Ergebnisse der Laborteichversuche, der Feldversuche und der DM-Prüfung direkt miteinander zu vergleichen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Trocknungsresistenz der drei Fischviren auf unterschiedlichen Oberflächen sind in Tabelle 33 zusammengefasst und in den Abbildungen 5-7 dargestellt.

Tabelle 33: Ergebnisse der Trocknungsresistenz auf verschiedenen Keimträgern

	HVAV 110			KHV-T			VHSV 1087		
	Metall	Holz	Filter (Virosorb)	Metall	Holz	Filter (Virosorb)	Metall	Holz	Filter (Virosorb)
Ausgangstiter ¹ (Virus + FKS)	7,48	n.b. ²	7,05	6,23	5,75	5,98	6,35	6,85	6,35
Trocknungszeit									
t ₀ ³	5,93 ⁴	5,00	4,52	4,27	n.b.	3,48	5,18	n.b.	3,18
45 min	2,45	n.b.	2,35	2,23	4,50	2,23	4,60	5,23	2,52
60 min	1,56	2,00	1,10	1,98	4,67	1,56	3,35	n.b.	2,85
90 min	1,39	1,50	1,10	1,14	5,08	1,10	3,18	n.b.	2,77

¹ Virustiter des Materials, das auf die Keimträger aufgebracht wurde in log₁₀KID₅₀/ml

² nicht bestimmt

³ Rückisolierung der Virussuspension unmittelbar nach dem Aufbringen

⁴ Titer des Restvirus nach der angegebenen Trockenzeit in log₁₀KID₅₀/ml

Abbildung 5: Resistenz von HVAV 110, KHV-T, VHSV 1087 gegenüber Trocknung auf Metallkeimträgern bei Raumtemperatur

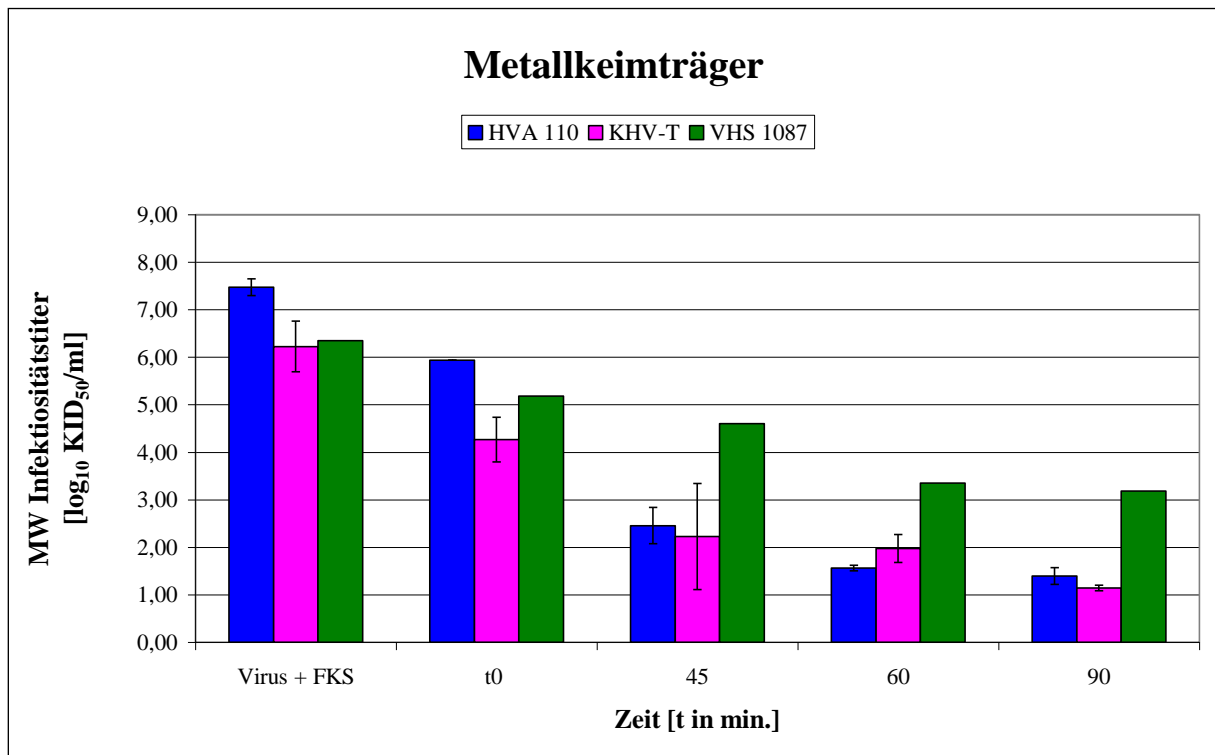


Abbildung 6: Resistenz von HVAV 110, KHV-T, VHSV 1087 gegenüber Trocknung auf Holzkeimträgern bei Raumtemperatur

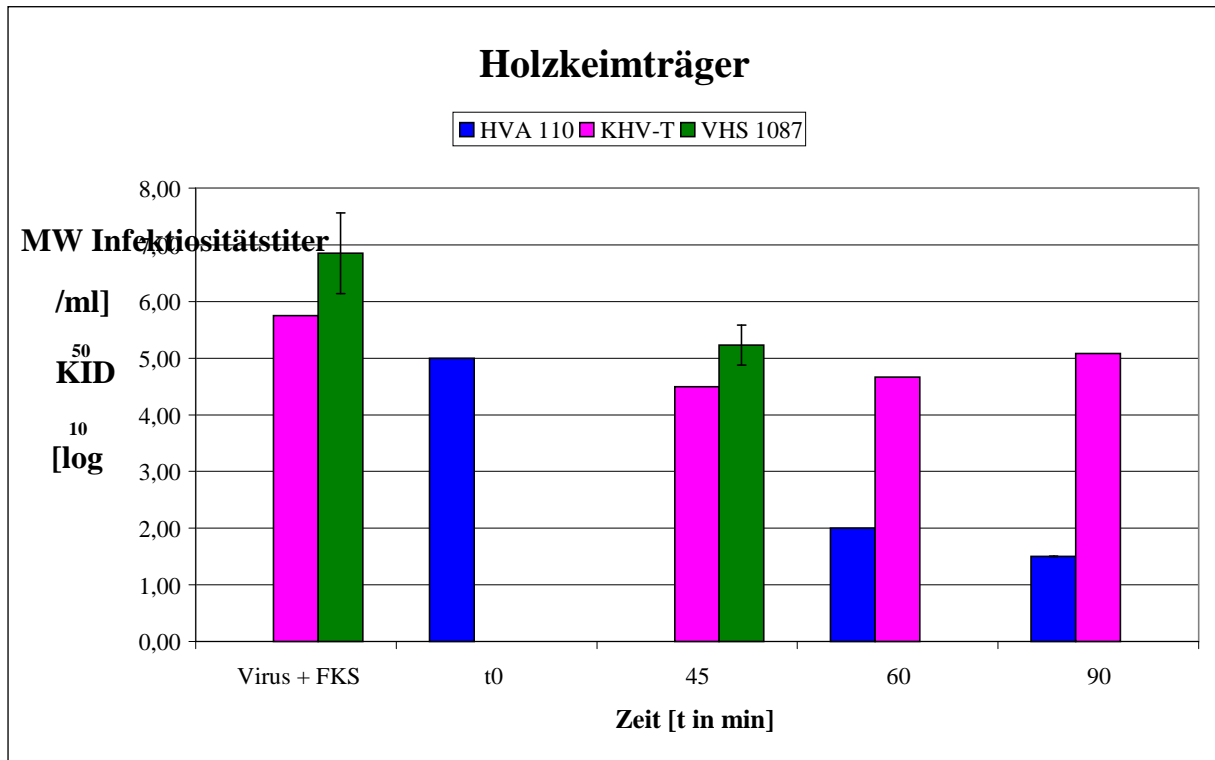
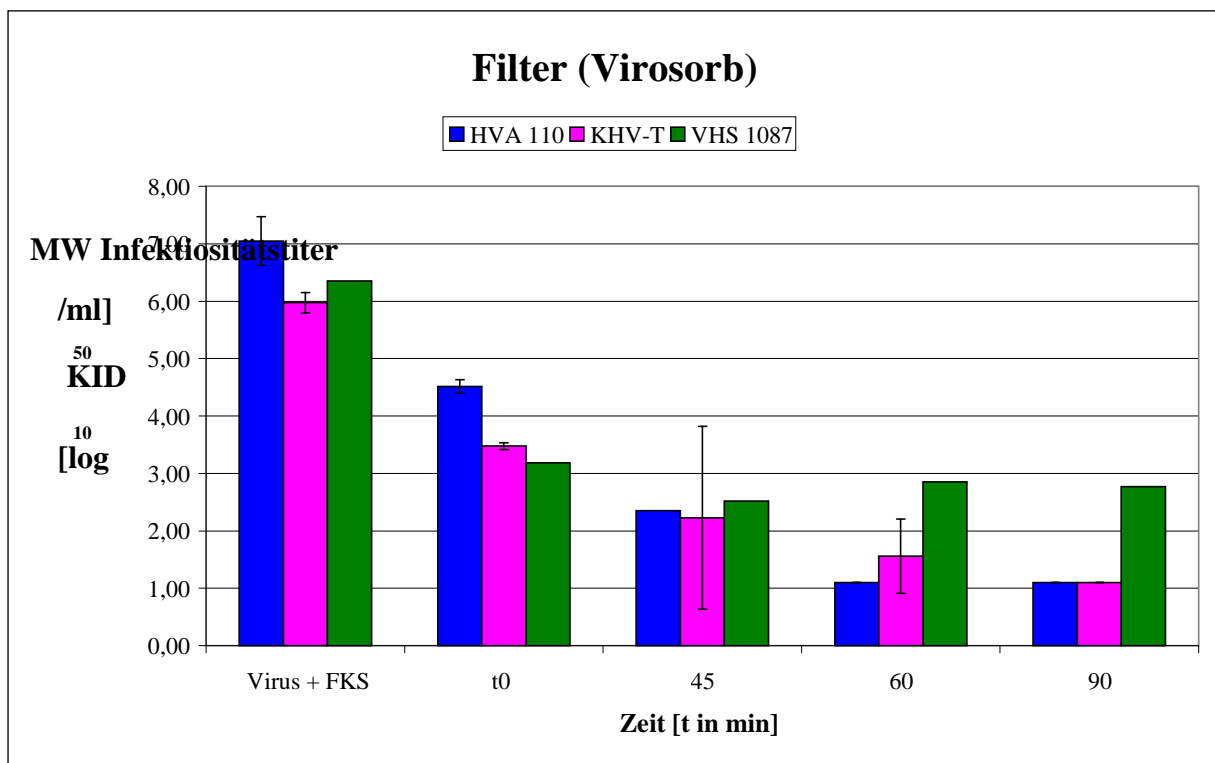


Abbildung 7: Resistenz von HVAV 110, KHV-T, VHSV 1087 gegenüber Trocknung auf einem Filter (Virosorb) bei Raumtemperatur



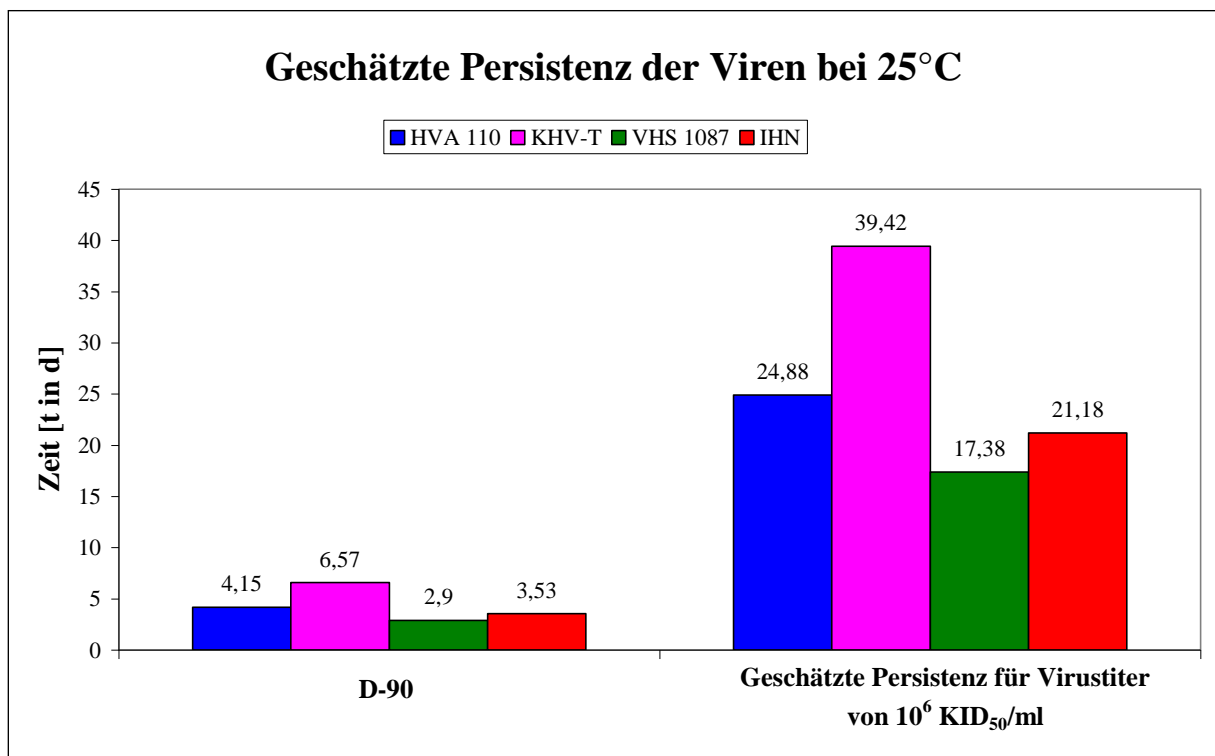
3.1.7 Feststellung der Resistenz der Viren gegenüber Wärmeeinwirkung

Zur Untersuchung der Empfindlichkeit der drei verschiedenen Testviren (VHSV 1087, HVAV 110, KHV-T) gegenüber verschiedenen Temperaturen wurden quantifizierte Virus-suspensionen mit den entsprechenden Temperaturen (25 °C, 40 °C, 55 °C, 70 °C) über verschieden lange Zeitintervalle behandelt und anschließend der Titer des vermehrungsfähigen Restvirus bestimmt. Basierend auf diesen Daten konnte dann für alle Temperaturen und Viren D90-Werte bestimmt werden, die eine Abschätzung der Thermoresistenz der Viren erlauben.

Wärmeinaktivierung bei 25 °C

Wurden die Viren bei 25 °C inkubiert, zeigte sich für alle Viren eine relativ gleichförmige Stabilität der Virusausgangstiterwerte über 9 d. Danach kam es zu einer deutlichen Reduktion der Virustiter. Bei VHSV 1087 und HVAV 110 war ab dem 18 d des Experiments kein Virus mehr nachweisbar. KHV-T sowie IHNV waren dagegen über die gesamte Versuchsdauer nachweisbar. Die berechneten D90-Werte bei 25 °C betragen für das VHSV 1087 2,9 d, für KHV-T 6,57 d, für HVAV 110 4,15 d und für das IHNV 3,53. Eine Übersicht über die D90-Werte bei 25 °C ist in Abbildung 8 dargestellt.

Abbildung 8: Persistenz der Viren bei 25°C



D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine log₁₀-Stufe = 90 % der Virusbelastung

Wärmeinaktivierung bei 40 °C

Wurden die Viren bei 40 °C inkubiert, zeigte sich für das VHSV 1087 eine Reduktion des Virustiters unter die Nachweisgrenze innerhalb von 60 min. KHV-T und HVAV 110 waren bei 40 °C thermostabiler und wurden über den Verlauf des Experiments (120 min) um 3 bzw. 4 log₁₀-Stufen reduziert.

Die berechneten D90-Werte bei 40 °C betragen für das VHSV 1087 8,83 min, für KHV-T 32,47 min, und für HVAV 110 27,40 min. Die Inaktivierungskinetik und eine Übersicht über die D90-Werte bei 40 °C sind in den Abbildung 9 und 10 dargestellt.

Abbildung 9: Inaktivierungskinetik der Viren bei 40 °C

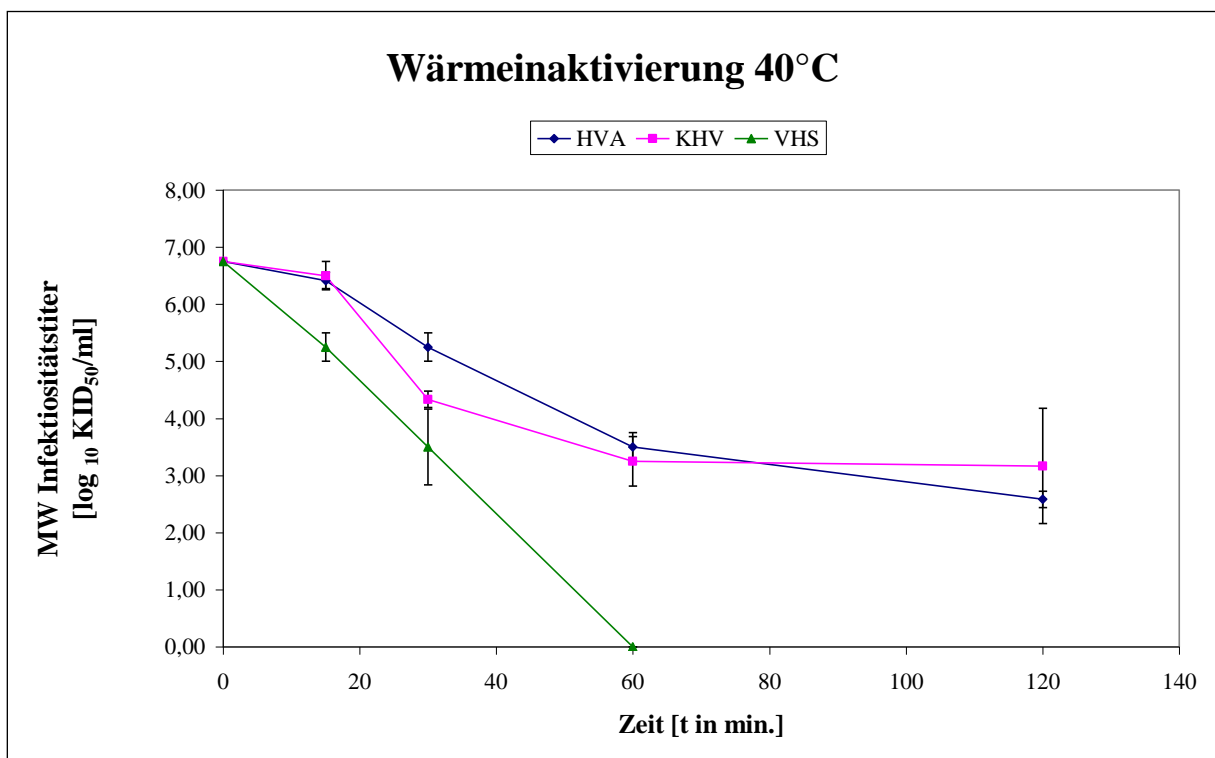
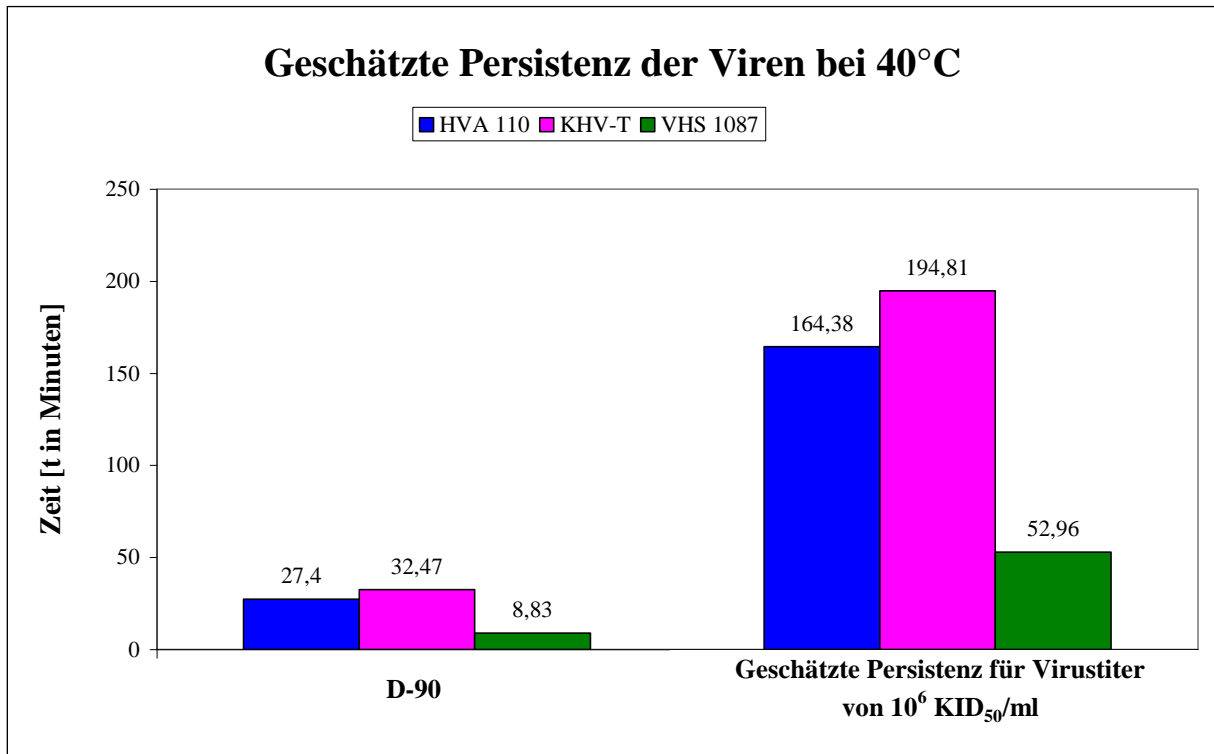


Abbildung 10: Persistenz der Viren bei 40 °C



D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine log₁₀-Stufe = 90 % der Virusbelastung

Wärmeinaktivierung bei 55 °C

Wurden die Viren bei 55 °C inkubiert, zeigte sich für das VHSV 1087, das KHV-T und das HVAV 110 eine Reduktion des Virustiters innerhalb von 10 min um 6 log₁₀-Stufen. Eine Reduktion der Virustiter um mindestens 4 log₁₀-Stufen war für das VHSV 1087 und das KHV-T in 3 min, für das HVAV 110 in 5 min erreicht.

Die berechneten D90-Werte bei 55 °C betragen für das VHSV 1087 1,45 min, für KHV-T 1,37 min, und für HVAV 110 1,31 min. Die Inaktivierungskinetik und eine Übersicht über die D90-Werte bei 55 °C sind in den Abbildung 11 und 12 dargestellt.

Abbildung 11: Inaktivierungskinetik der Viren bei 55 °C

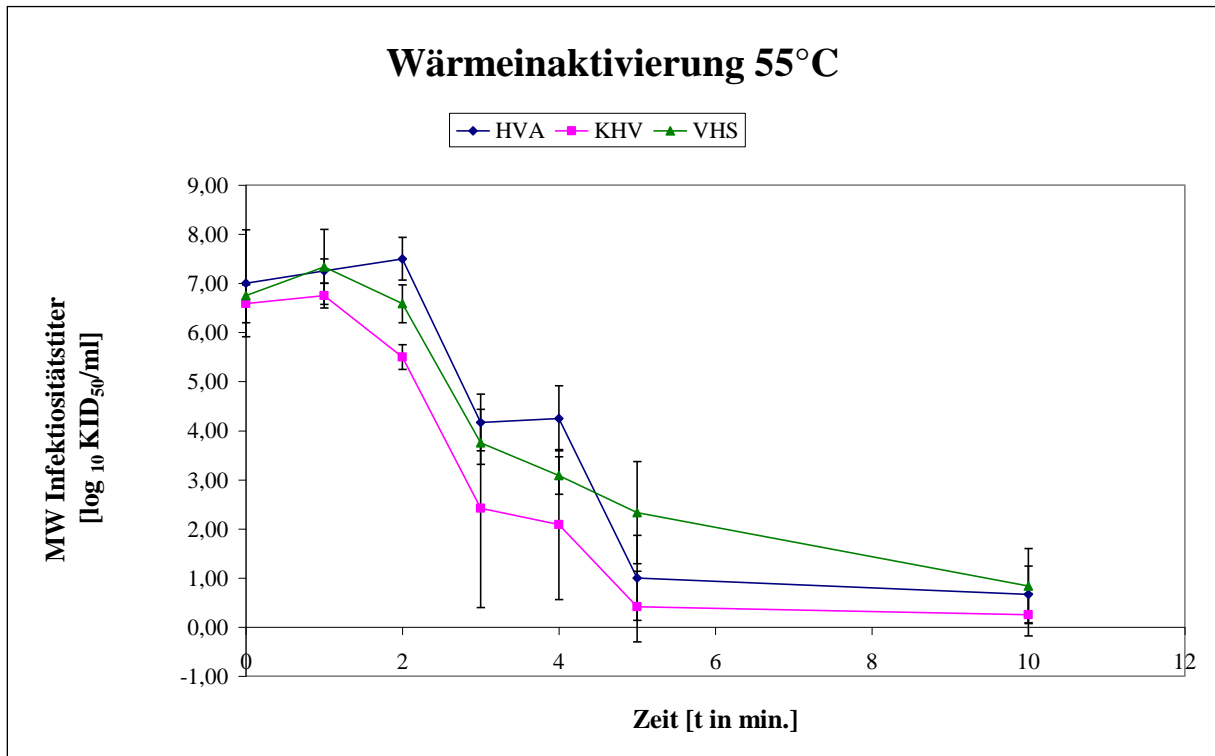
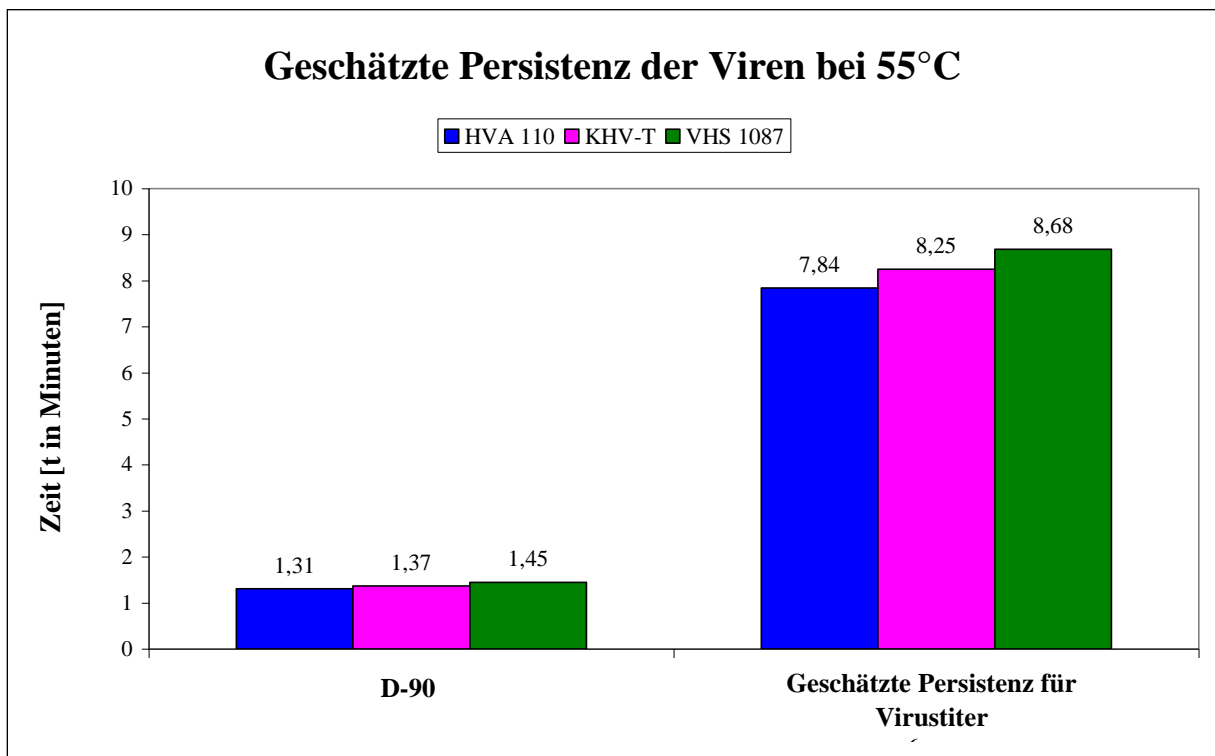


Abbildung 12: Persistenz der Viren bei 55 °C



D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine log₁₀-Stufe = 90 % der Virusbelastung

Wärmeinaktivierung bei 70 °C

Wurden die Viren bei 70 °C inkubiert, wurde für das VHSV 1087 innerhalb von 5 min eine Reduktion der Virusmenge unter die Nachweisgrenze erreicht, für das KHV-T dauerte diese Reduktion des Ausgangsvirustiters ebenfalls 5 min und für das HVAV 110 10 min. Eine Reduktion der Virustiter um mindestens 4 log₁₀-Stufen war für das VHSV 1087 und das HVAV 110 in 2 min, für das KHV-T in 3 min erreicht.

Die berechneten D90-Werte bei 70 °C betragen für das VHSV 1087 0,66 min, für KHV-T 1,41 min, und für HVAV 110 1,80 min. Die Inaktivierungskinetik und eine Übersicht über die D90-Werte bei 70 °C sind in den Abbildung 13 und 14 dargestellt.

Abbildung 13: Inaktivierungskinetik der Viren bei 70 °C

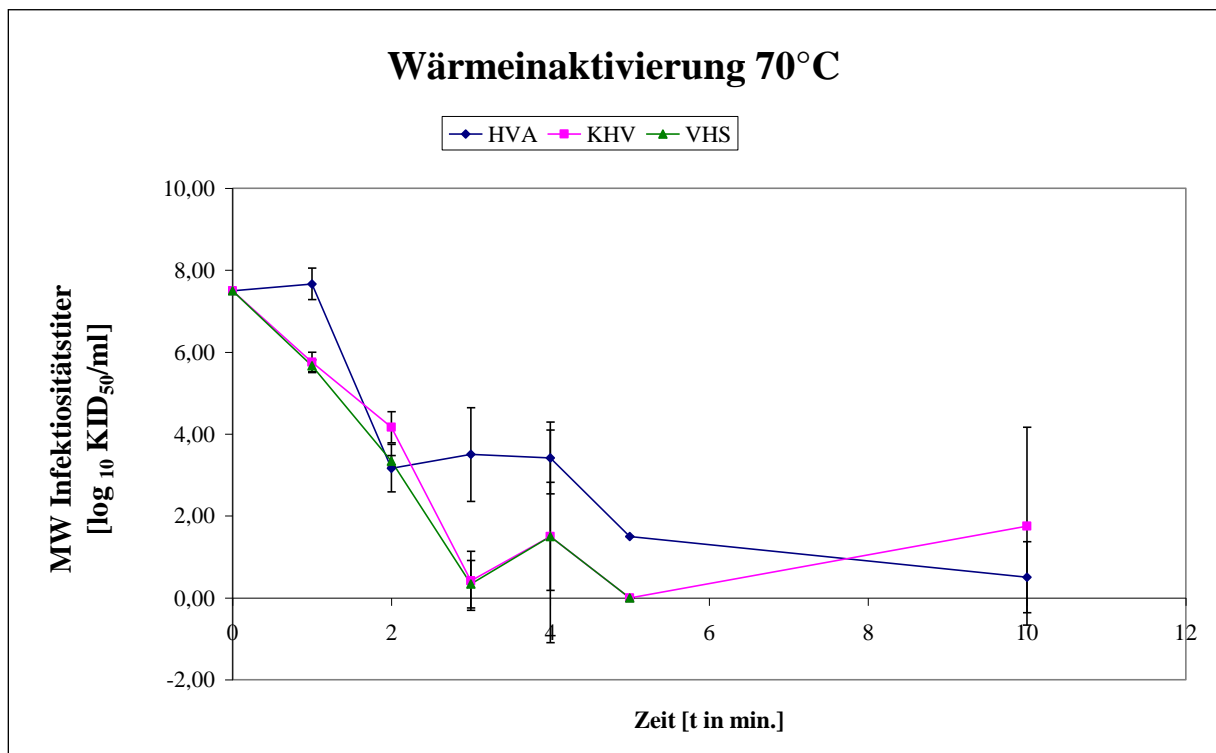
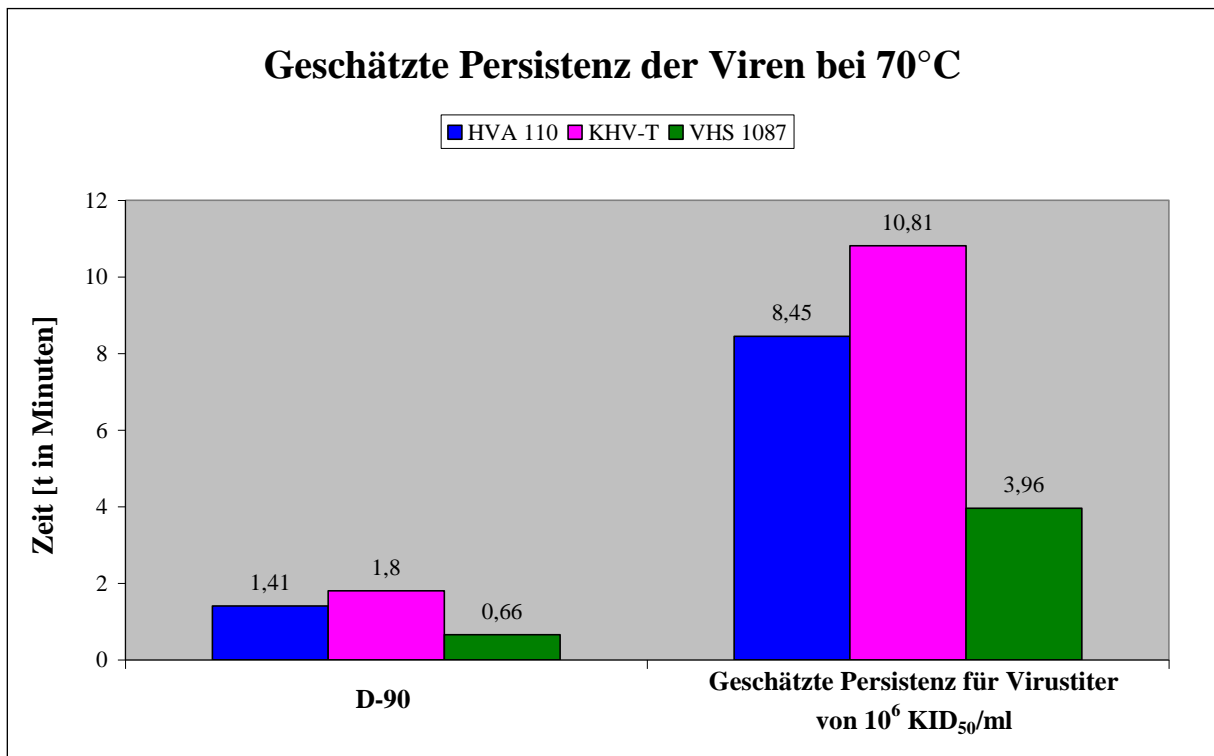


Abbildung 14: Persistenz der Viren bei 70 °C



D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine log₁₀-Stufe = 90 % der Virusbelastung

3.1.8 Untersuchungen zur Inaktivierung verschiedener Fischviren mittels verschiedener Kalkformulierungen in Laborteichen

Zur Untersuchung der Desinfektionswirkung von Branntkalk und Löschkalk in Fischanlagen wurden standardisierte Laborversuche in Kleinteichen durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Sedimente eingesetzt, i.e. aus dem Hohenheimer Eiszeitteich (HES), aus einer Fischanlage im Landkreis Calw (CAS) und ein artifiziell hergestelltes sog. Standardsediment (STS).

In diese Laborteiche wurden die zu untersuchenden Viren (VHSV, KHV, HVAV) auf sog. Sandwichkeimträgern an verschiedenen Lokalisationen eingebracht (Wasser, Oberfläche des Sediments, in 3 cm Tiefe des Sediments). Der Branntkalk und der Löschkalk wurde in das Wasser eingebracht und damit der pH-Wert des Teichsystems auf zwei verschiedene Werte (pH 11, pH 12) eingestellt und über den gesamten Testzeitraum auf dem jeweiligen pH-Wert durch Nachkalkung gehalten. Zur Bestimmung der Zeit, die in diesem System benötigt wird, um die Testviren um eine \log_{10} -Stufe bzw. um 90 % zu reduzieren (D90-Wert), wurden in regelmäßigen Zeitabständen Sandwichkeimträger aus den einzelnen Bereichen der Laborteiche entnommen und die Testviren quantitativ re-isoliert.

Inaktivierung von KH-Viren durch Kalk in Laborteichen

In den Laborteichen, die mit dem CAS betrieben wurden, wurde bei der Verwendung von Branntkalk bei einem pH-Wert 11 im Wasser ein durchschnittlicher D90-Wert von 1,59 Tagen, an der Oberfläche des Sedimentes von 1,53 Tagen und in 3 cm Tiefe im Sediment von 5,64 Tagen gefunden. Bei einem pH-Wert von 12 waren die Werte 1,43 Tage im Wasser, 0,97 Tage auf Sedimentoberfläche und 4,11 Tage in der Sedimenttiefe.

Wurde die Desinfektion mit Löschkalk durchgeführt, ergaben sich bei pH 11 folgende Werte: 1,98 Tage im Wasser, 1,84 Tage an der Sedimentoberfläche und 4,65 Tage im Sediment (3 cm unter der Oberfläche). Bei einem pH-Wert von 12 dauerte es im Durchschnitt 1,21 Tage im Wasser, 1,47 Tage an der Oberfläche des Sediments und 2,54 Tage in 3 cm Tiefe um das Virus um 90% zu reduzieren.

In den Laborteichen, die mit dem HES betrieben wurden, konnte das KH-Virus mittels Branntkalk bei einem pH-Wert von 11 im Wasser innerhalb von 3,11 Tagen um 90% reduziert werden. An der Oberfläche des Sediments dauerte dieselbe Reduzierung 2,31 Tage, innerhalb des Sediments 5,49 Tage. Bei Verwendung von Löschkalk und pH 11 ergaben sich folgende Werte: Wasser: 4,27 Tage, Oberfläche Sediment: 2,62 Tage und 3 cm-

Sedimenttiefe: 5,27 Tage. Die Ergebnisse der KH-Virus-Inaktivierung in Laborteichen unter der Verwendung von Brannt- und Löschkalk ist in Tabelle 34 und Abbildung 15 dargestellt.

Tabelle 34: D90-Werte (in Tagen) des KH-Virus T in Laborteichen unter Verwendung von verschiedenen Sedimenten und Kalkformulierungen

Branntkalk/CAS ¹			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	1,59±0,54 ²	1,53±0,52	5,64±3,66
12	1,43±0,53	0,97±0,43	4,11±1,30
Löschkalk/CAS			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	1,98±0,22	1,84±0,88	4,56±2,56
12	1,21±0,18	1,47±0,43	2,54±0,19
Branntkalk/HES ³			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	3,11±1,27	2,31±0,23	5,49±3,53
12	0,71±0,37	2,58±2,01	2,45±1,06
Löschkalk/HES			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	4,27±0,33	2,62±0,49	5,27±3,31
12	0,90±0,59	0,80±0,21	2,59±0,75
Branntkalk/STS ⁵			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	n.d.	n.d.	n.d.
12	n.d.	n.d.	n.d.
Löschkalk/STS			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	n.d.	n.d.	n.d.
12	n.d.	n.d.	n.d.

¹ Verwendetes Laborteichsediment stammt aus einer Fischanlage im Landkreis Calw

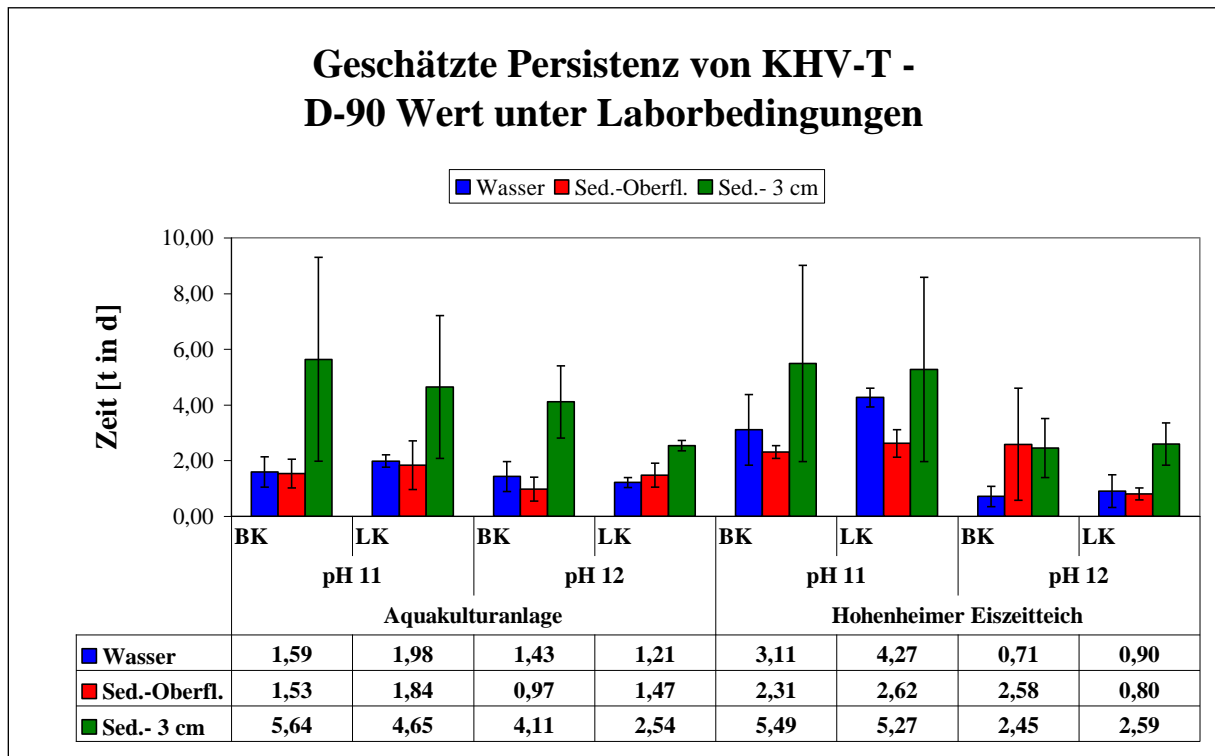
² D90-Wert in Tagen (Mittelwert±Standardabweichung)

³ Verwendetes Laborteichsediment stammt aus dem Hohenheimer Eiszeitteich

⁴ nicht durchgeführt

⁵ Verwendetes Laborteichsediment ist ein artifiziiell hergestelltes Standardsediment

Abbildung 15: Persistenz von KHV-T unter Laborbedingungen bei pH 11 und pH 12 (4 °C) mit Oberflächenwasser/Sediment aus einer Aquakulturanlage und dem Hohenheimer Eiszeitteich



D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine \log_{10} -Stufe = 90% der Virusbelastung

BK=Brantkalk

LK=Löschkalk

Inaktivierung von VHS-Virus 1087 durch Kalk in Laborteichen

In den Laborteichen, die mit dem CAS betrieben wurden, wurde bei Verwendung von Brantkalk bei einem pH-Wert 11 im Wasser ein durchschnittlicher D90-Wert von 5,61 Tagen, an der Oberfläche des Sedimentes von 2,63 Tagen und in 3 cm Tiefe im Sediment von 5,96 Tagen gefunden. Bei einem pH-Wert von 12 waren die Werte 1,36 Tage im Wasser, 0,82 Tage auf Sedimentoberfläche und 4,12 Tage in der Sedimenttiefe.

Wurde die Desinfektion mit Löschkalk durchgeführt, ergaben sich bei pH 11 folgende Werte: 9,88 Tage im Wasser, 10,90 Tage an der Sedimentoberfläche und 8,49 Tage im Sediment (3 cm unter der Oberfläche). Bei einem pH-Wert von 12 dauerte es im Durchschnitt 3,52 Tage im Wasser, 2,25 Tage an der Oberfläche des Sediments und 2,84 Tage in 3 cm Tiefe um das Virus um 90 % zu reduzieren.

In den Laborteichen, die mit dem HES betrieben wurden, konnte das VHS-Virus mittels Brantkalk bei einem pH-Wert von 11 im Wasser innerhalb von 2,54 Tagen um 90 % reduziert werden. An der Oberfläche des Sediments dauerte dieselbe Reduzierung 2,38 Tage,

innerhalb des Sediments 5,17 Tage. Bei Verwendung von Löschkalk und pH 11 ergaben sich folgende Werte: Wasser: 2,40 Tage, Oberfläche Sediment: 3,70 Tage und 3 cm-Sedimenttiefe: 11,94 Tage. Bei Einstellung der Laborteiche, die mit dem Hohenheimer Eiszeiteich-Sediment betrieben wurde, auf pH 12 mittels Branntkalk wurden folgende D90-Werte festgestellt: Wasser: 1,77 d, Sedimentoberfläche: 0,46 Tage und in 3 cm Tiefe des Sediments: 6,90 Tage. Bei Verwendung von Löschkalk und pH 12 wurde das Virus im HES-Laborteich im Wasser innerhalb von durchschnittlich 3,56 Tagen um 90 % reduziert, an der Sedimentoberfläche in 0,94 Tagen und im Sediment (3 cm Tiefe) in 8,04 Tagen.

Im Laborteich, der ein sog. Standardsediment enthielt und durch Branntkalk auf pH 12 eingestellt wurde, zeigte sich für das Wasser ein D90-Wert von 2,53 Tagen im Wasser, von 1,11 Tagen an der Sedimentoberfläche und von 2,91 Tagen in 3 cm Sedimenttiefe.

Die Ergebnisse der VHS-Virus 1087 Inaktivierung in Laborteichen unter der Verwendung von Brannt- und Löschkalk ist in Tabelle 35 und Abbildung 16 dargestellt.

Tabelle 35: D90-Werte (in Tagen) des VHS-Virus 1087 in Laborteichen unter Verwendung von verschiedenen Sedimenten und Kalkformulierungen

Branntkalk/CAS ¹			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	5,61±2,57 ²	2,63±1,02	5,96±5,48
12	1,36±0,32	0,82±0,74	4,12±2,77
Löschkalk/CAS			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	9,88±10,58	10,90±9,50	8,49±11,79
12	3,52±3,04	2,25±2,13	2,84±2,59
Branntkalk/HES ³			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	2,54±0,65	2,38±1,31	5,17±3,48
12	1,77±1,76	0,46±0,38	6,90±7,53
Löschkalk/HES			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	2,40±0,54	3,70±2,30	11,94±14,35
12	3,56±4,39	0,94±0,79	8,04±6,72
Branntkalk/STS ⁵			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	n.d.	n.d.	n.d.
12	2,53±3,20	1,11±1,18	2,91±2,27
Löschkalk/STS			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	n.d.	n.d.	n.d.
12	n.d.	n.d.	n.d.

¹ Verwendetes Laborteichsediment stammt aus einer Fischanlage im Landkreis Calw

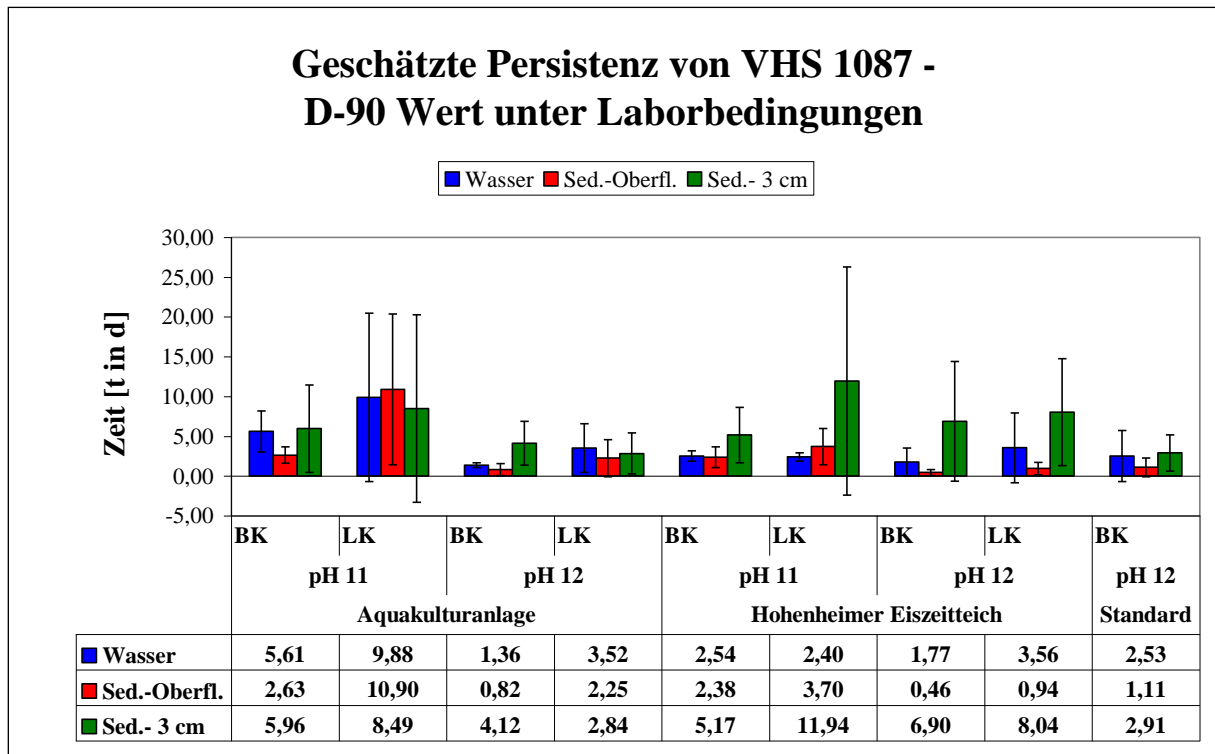
² D90-Wert in Tagen (Mittelwert±Standardabweichung)

³ Verwendetes Laborteichsediment stammt aus dem Hohenheimer Eiszeitteich

⁴ nicht durchgeführt

⁵ Verwendetes Laborteichsediment ist ein künstlich hergestelltes Standardsediment

Abbildung 16: Persistenz von VHSV 1087 unter Laborbedingungen bei pH 11 und pH 12 (4 °C) mit Oberflächenwasser/Sediment aus einer Aquakulturanlage, dem Hohenheimer Eiszeitteich und einem Standard-sediment



D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine \log_{10} -Stufe = 90% der Virusbelastung

BK=Branntkalk

LK=Löschkalk

Inaktivierung von HVA-Virus 110 durch Kalk in Laborteichen

In den Laborteichen, die zur Untersuchung der Inaktivierung von HVAV 110 verwendet wurden, wurde das Sediment aus dem Hohenheimer Eiszeitteich gewonnen. Das HVA-Virus konnte mittels Branntkalk bei einem pH-Wert von 12 im Wasser innerhalb von 0,59 Tagen um 90 % reduziert werden. An der Oberfläche des Sediments dauerte dieselbe Reduzierung 0,48 Tage, innerhalb des Sediments 2,57 Tage. Bei Verwendung von Löschkalk und pH 12 ergaben sich folgende Werte: Wasser: 1,16 Tage, Oberfläche Sediment: 1,00 Tage und 3 cm-Sedimenttiefe: 2,64 Tage.

Die Ergebnisse der HVA Virus 110 Inaktivierung in Laborteichen unter der Verwendung von Brannt- und Löschkalk ist in Tabelle 36 und Abbildung 17 dargestellt.

Tabelle 36: D90-Werte (in Tagen) des HVA-Virus 110 in Laborteichen unter Verwendung von verschiedenen Sedimenten und Kalkformulierungen

Branntkalk/CAS ¹			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	n.d.	n.d.	n.d.
12	n.d.	n.d.	n.d.
Löschkalk/CAS			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	n.d.	n.d.	n.d.
12	n.d.	n.d.	n.d.
Branntkalk/HES ³			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	n.d.	n.d.	n.d.
12	0,59±0,12	0,48±0,20	2,57±1,07
Löschkalk/HES			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	n.d.	n.d.	n.d.
12	1,16±0,23	1,00±0,10	2,64±0,31
Branntkalk/STS ⁵			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	n.d.	n.d.	n.d.
12	n.d.	n.d.	n.d.
Löschkalk/STS			
pH-Wert	Wasser	Oberfläche Sediment	Sediment (3 cm-Tiefe)
11	n.d.	n.d.	n.d.
12	n.d.	n.d.	n.d.

¹ Verwendetes Laborteichsediment stammt aus einer Fischanlage im Landkreis Calw

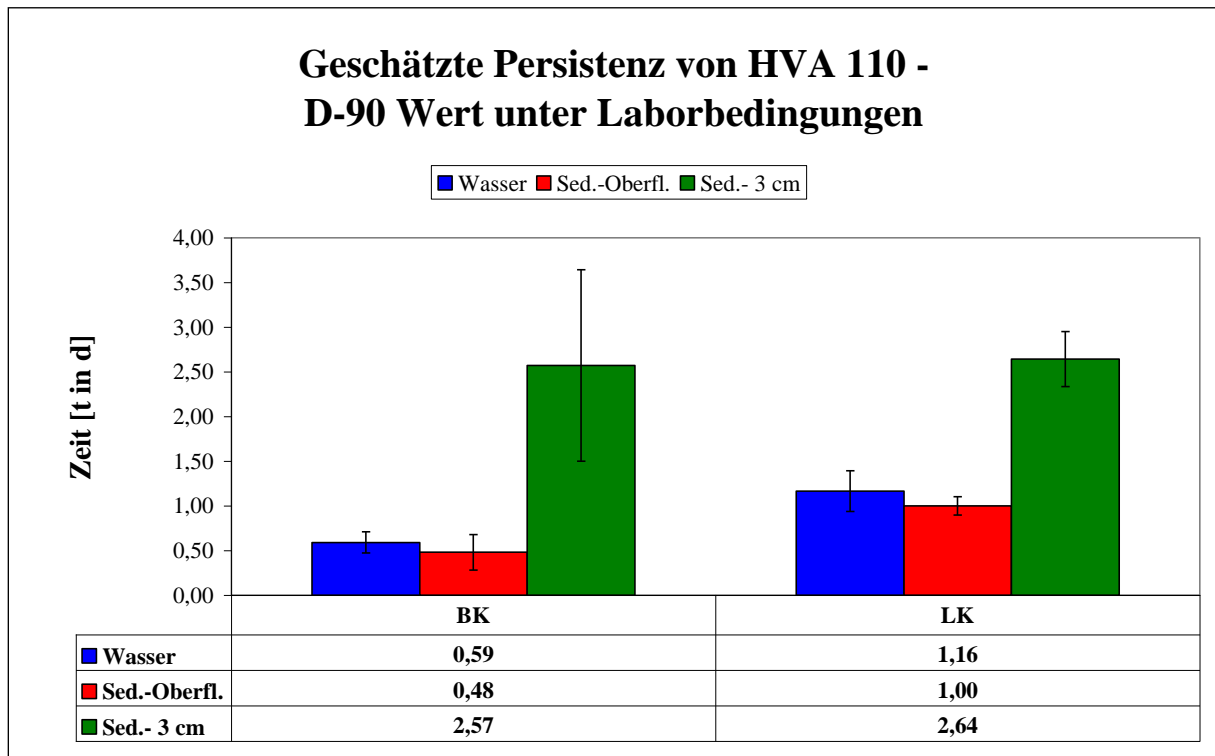
² D90-Wert in Tagen (Mittelwert±Standardabweichung)

³ Verwendetes Laborteichsediment stammt aus dem Hohenheimer Eiszeitteich

⁴ nicht durchgeführt

⁵ Verwendetes Laborteichsediment ist ein artifizuell hergestelltes Standardsediment

Abbildung 17: Persistenz von HVA 110 unter Laborbedingungen bei pH 11 und pH 12 (4 °C) mit Oberflächenwasser/Sediment aus dem Hohenheimer Eiszeitteich



D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine \log_{10} -Stufe = 90% der Virusbelastung

BK=Brantkalk

LK=Löschkalk

3.1.9 Feldversuche

Feldversuche

In Absprache mit den Kooperationspartnern und den zuständigen Behörden wurden insgesamt drei Feld- oder Freilandversuche durchgeführt. Diese fanden jeweils in Zusammenhang mit einem Ausbruch einer anzeigepflichtigen Fischseuche statt. In allen drei Fällen handelte es sich dabei um die Virale Hämorrhagische Septikämie der Forellen. Für die Freilandversuche wurden jeweils die entsprechenden Ausbruchs-Virusisolate verwendet. Diese wurden mit der von Nazir et al (2010) beschriebenen Labormethode auf Sandwichkeimträger übertragen.

Feldversuch 1

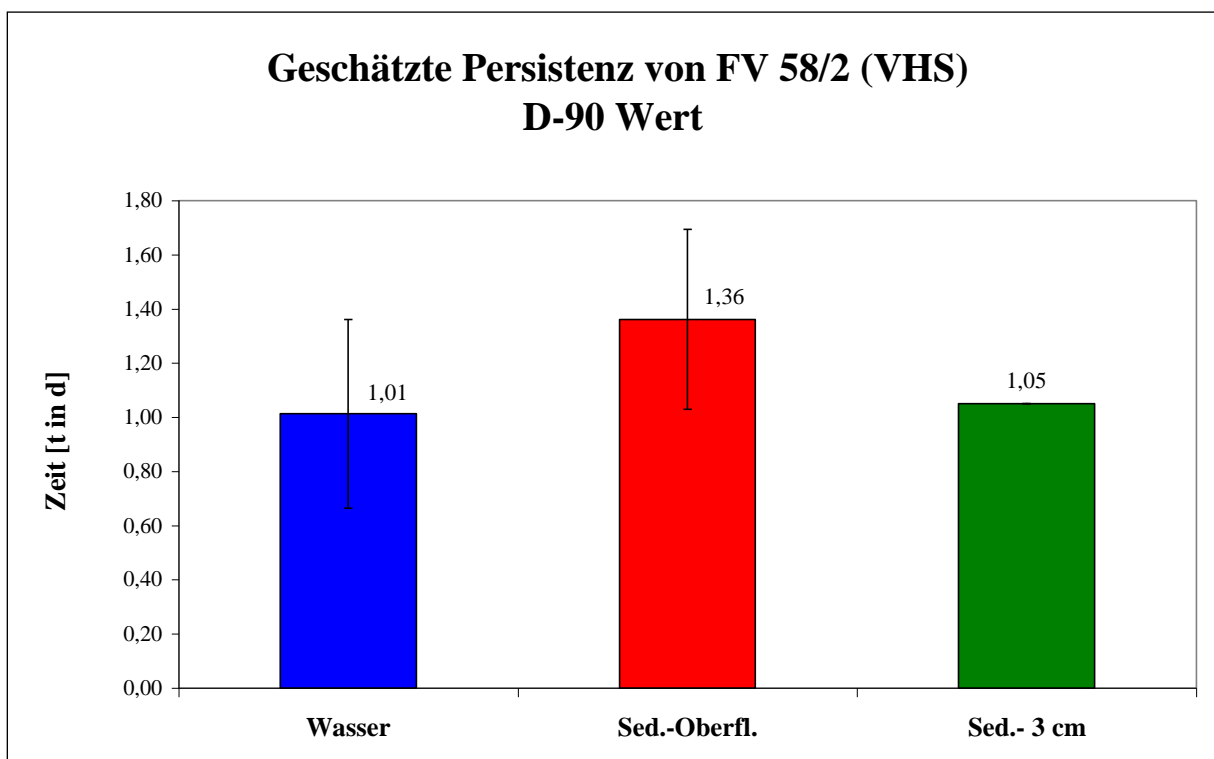
Der erste Feldversuch wurde in einer Aquakulturanlage im Landkreis Schwäbisch Hall durchgeführt. Das Ausbruchs-Isolat war das FV 58/2 (VHS-Virus).

Bei diesem Feldversuch wurden 3 Forellenteiche über 5 Tage beprobt. Es wurden Sandwichkeimträger jeweils im Sediment (3 cm Tiefe), an der Sedimentoberfläche und an der Wasseroberfläche eingebracht. In einem der Teiche war eine Beprobung im Sediment nicht

möglich, da dieser bereits geflutet und mit Löschkalk vorbehandelt war. Die Teiche wurden mittels Branntkalk bei pH 12 desinfiziert. Der pH-Wert wurde über 5 Tage auf konstant ≥ 12 gehalten.

Der Titer des Virus war nach 5 Tagen im Wasser und an der Sedimentoberfläche um mehrere \log_{10} -Stufen bis unter die Nachweisgrenze reduziert. In der Sedimenttiefe von 3 cm konnte bis Tag 5 eine Virusreduktion von nur 2 \log_{10} -Stufen nachgewiesen werden. Das Ergebnis der FV 58/2-Virus-Inaktivierung in Fischteichen unter Feldbedingungen unter Verwendung von Branntkalk (berechnete D90-Werte) ist in Abbildung 18 dargestellt.

Abbildung 18: Feldversuch 1: Persistenz von FV 58/2-Virus (VHSV) in Fischteichen

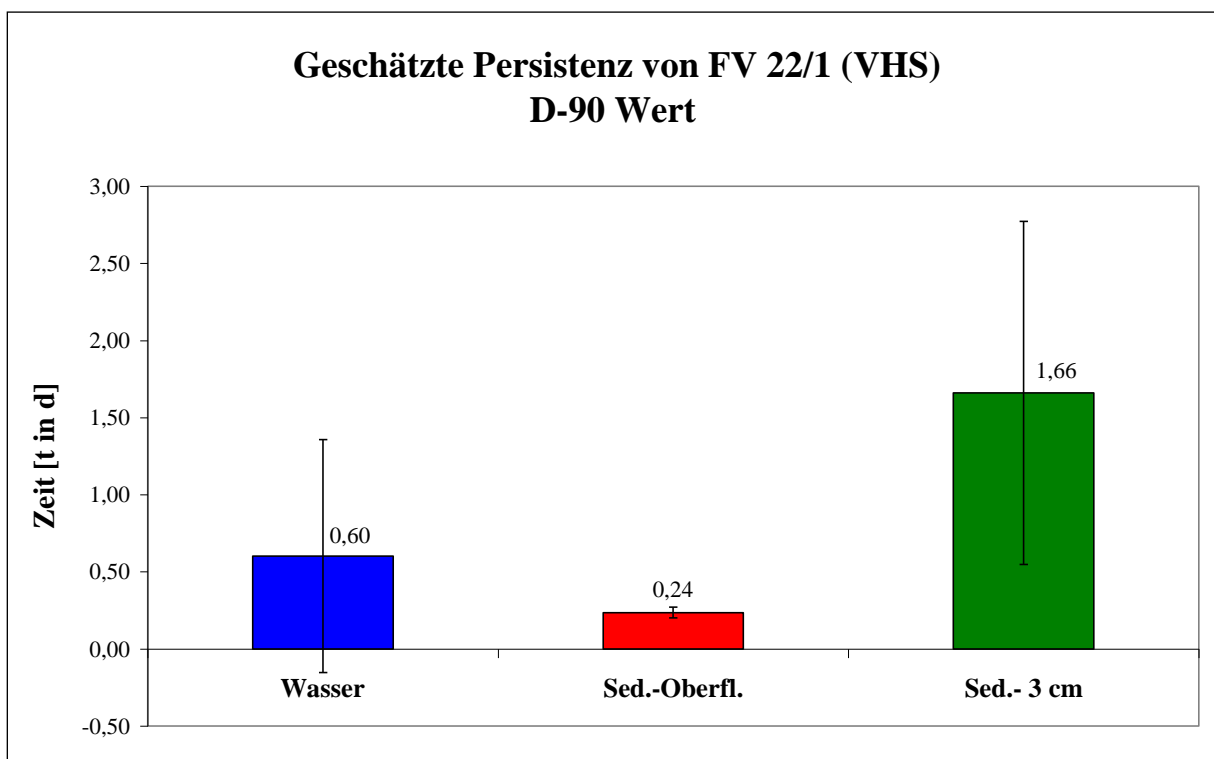


Feldversuch 2

Ein weiterer Freilandversuch wurde in einer Aquakulturanlage im Landkreis Karlsruhe mit dem Freilandvirus FV 22/1 (VHSV) durchgeführt. Insgesamt wurden 4 Forellenteiche untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie beim ersten Freilandversuch. Zusätzlich wurde der aus den Teichen ausgehobene Boden für die Inaktivierungsversuche verwendet. Dabei wurden Sandwichkeimträger einerseits in den noch ungekalkten Teichboden in Tiefen von 3 cm, 5 cm und 10 cm eingebracht und anschließend gekalkt. Andererseits wurden Sandwichkeimträger in bereits mit Branntkalk durchmischten Teichboden in einer Tiefe von 10 cm installiert und die Virustiterreduktion über 5 d untersucht.

Wie bereits im ersten Feldversuch reduzierte sich der Virusausgangstiter im Wasser nach 5 Tagen soweit, dass in der Rücktitration kein Virus mehr nachweisbar war. Das gleiche Ergebnis konnte für die Sandwichkeimträger, die an der Sedimentoberfläche installiert wurden, festgestellt werden. In der Sedimenttiefe von 3 cm konnte bereits ab Tag 1 eine Virusreduktion von über 4 log₁₀-Stufen nachgewiesen werden. Trotzdem verblieb bis Tag 5 ein Restvirustiter von 0,27 log₁₀KID₅₀/ml auf den Sandwichkeimträgern. Das Ergebnis der FV 22/1-Virus-Inaktivierung in Fischteichen unter Feldbedingungen und Verwendung von Branntkalk (berechnete D90-Werte) ist in Abbildung 19 dargestellt.

Abbildung 19: Feldversuch 2: Persistenz von FV 22/1-Virus (VHSV) in Fischteichen

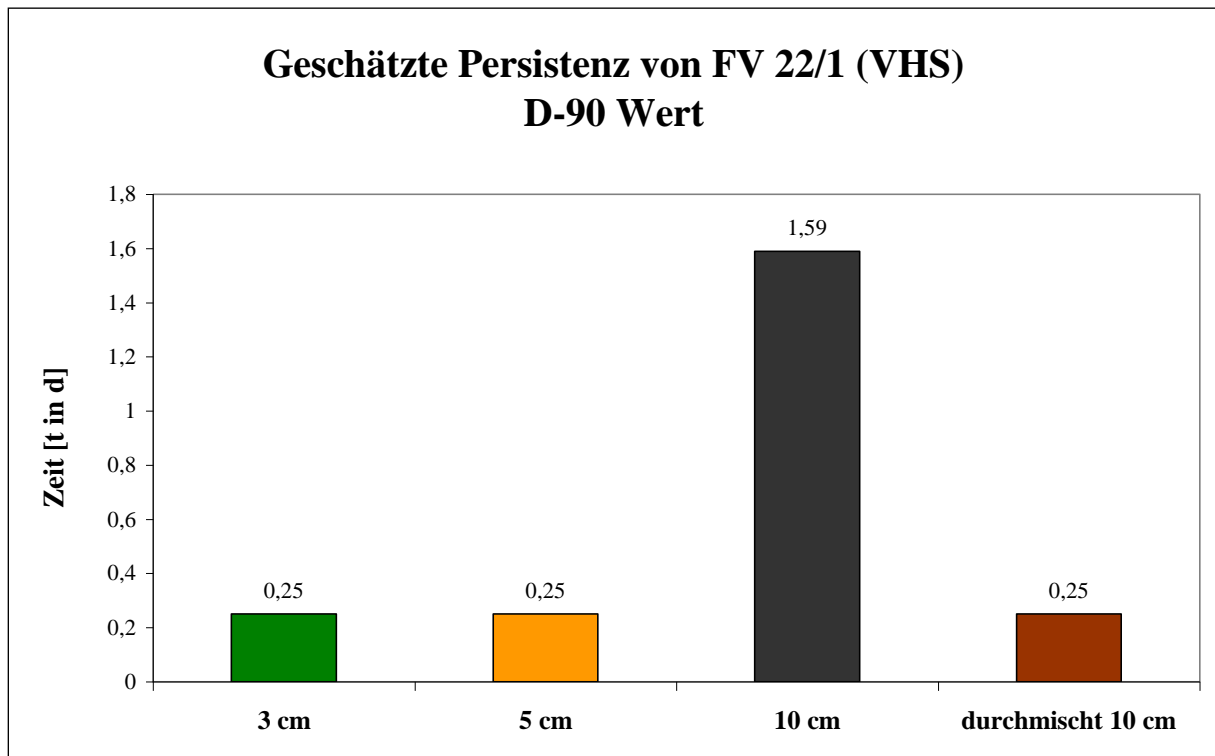


In den Bodenproben konnte ab Tag 1 in 3 cm und 5 cm Tiefe kein Virus mehr nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildete nur die Beprobung in 10 cm Tiefe, da hier erst eine Reduktion des Virustiters unter die Nachweisgrenze zwischen Tag 3 und Tag 5 erfolgte.

In dem bereits mit Branntkalk durchmischten Teichboden konnte in einer Tiefe von 10 cm ab Tag 1 ebenfalls kein Virus mehr re-isoliert werden.

Das Ergebnis der FV 22/1-Virus-Inaktivierung in den Bodenproben der Aquakulturanlage unter Feldbedingungen unter Verwendung von Branntkalk (berechnete D90-Werte) ist in Abbildung 20 zusammengefasst.

Abbildung 20: Feldversuch 2: Persistenz von FV 22/1-Virus (VHSV) in Bodenproben



Die erfolgreiche Desinfektion der Teiche und des Bodens im Feldversuch 2 konnte durch die Kalkung mit Branntkalk und der Aufrechterhaltung des durchschnittlichen pH-Wertes von 12,69 sowie der durchschnittlichen Teichtemperatur von 18,92 °C erklärt werden.

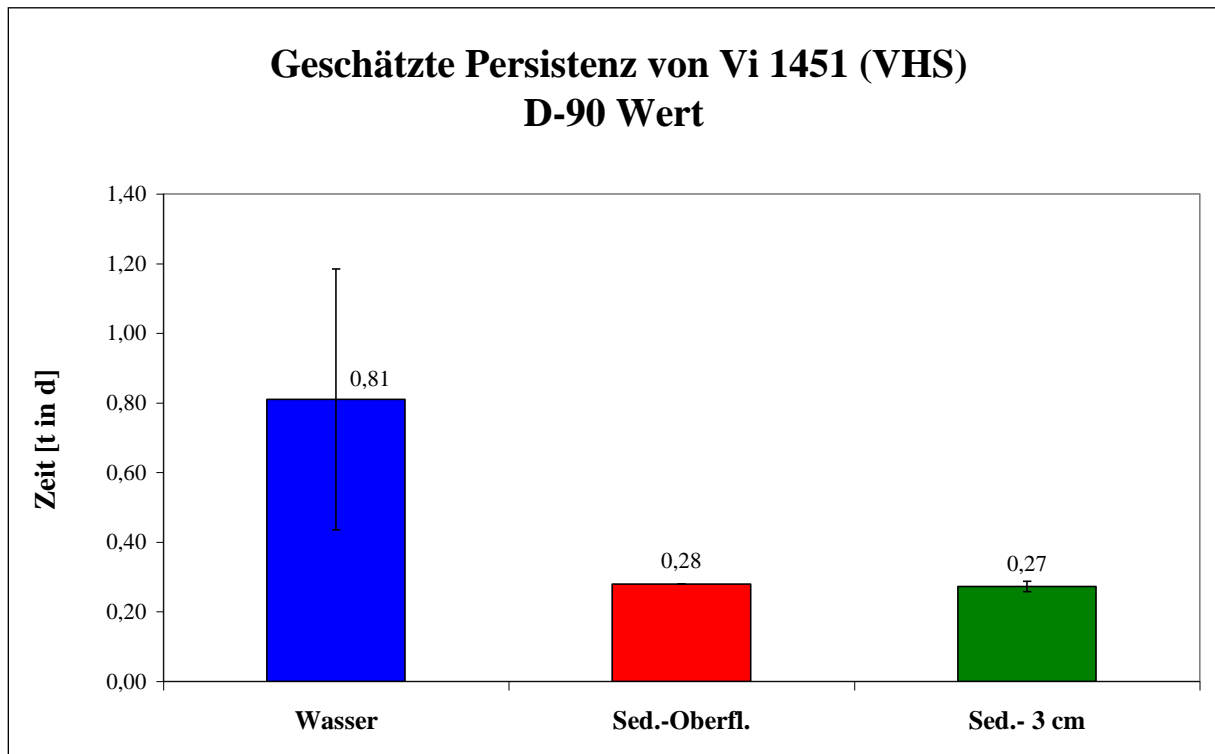
Feldversuch 3

Ein weiterer Freilandversuch fand in einer Aquakulturanlage im Landkreis Ortenaukreis statt und wurde mit dem Freilandvirus Vi 1451 (VHSV) durchgeführt. Insgesamt wurden 4 Forellenteiche beprobt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie beim ersten Freilandversuch. Zwei der Teiche wurden nicht mit Wasser gefüllt, so dass hier eine Beprobung nur im Sediment (3 cm Tiefe) und an der Sedimentoberfläche durchgeführt werden konnte.

Die Virusausgangstiter wurden jeweils in den bespannten (mit Wasser gefüllt) und unbespannten Teichen an der Sediment-Oberfläche und in 3 cm Sedimenttiefe innerhalb von einem Tag nach der Kalkung bis unter die Nachweisgrenze des Kultursystems reduziert. Im Wasser war das Virus erst nach drei Tagen nicht mehr nachweisbar. Aufgrund dieser Ergebnisse war die Desinfektionsmaßnahme als erfolgreich anzusehen, da der Titer in allen untersuchten Proben innerhalb von mindestens 3 Tagen um mehr als 4 log₁₀-Stufen (\cong 99,99 % des Virustiters) reduziert werden konnte. Das Ergebnis der Vi 1451-Virus-

Inaktivierung in Fischteichen unter Feldbedingungen unter Verwendung von Branntkalk (berechnete D90-Werte) ist in Abbildung 21 dargestellt.

Abbildung 21: Feldversuch 3: Persistenz von Vi 1451-Virus (VHSV) in Fischteichen



3.1.10 Rohdaten der Laborversuche

Die Rohdaten aller Laborversuche zur Testung der Fischviren gegen verschiedene Desinfektionsverfahren sind in den Tabellen A1-A38 im Anhang I zusammenfassend dargestellt.

3.1.11 Literaturstudie zur Ökotoxikologie von Desinfektionsverfahren

Im Rahmen der Studie hat sich gezeigt, dass für einige Wirkstoffe ein ökotoxikologischer Standarddatensatz (Alge, Daphnie, Fisch) vorliegt, so dass hier eine Gruppierung nach Gefährdungspotential möglich ist.

Eine erste, sehr konservative Risikoabschätzung ergab, dass die in den Teichen eingesetzten Konzentrationen deutlich oberhalb der aus ökotoxikologischen Daten zu Algen, Crustaceen, Mollusken und Fischen abgeleiteten ökologischen Schwellenkonzentration liegen können. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der Teich in diesem Fall ja auch die Zielfläche der Anwendung ist, Effekte hier also in Relation zu erwünschten Wirkung akzeptiert werden können.

Unsicherheiten dieser Abschätzung beruhen zum einen auf der Annahme, dass die Konzentration im Oberflächengewässer der maximalen nominalen Konzentration der Wirkstoffe im Teich entspricht. Wird angenommen, dass durch Abbau und Verdünnung die Konzentration im Oberflächengewässer um 90 % reduziert ist, ergeben sich für XY noch Risikoquotienten über 1. Eine weitere Unsicherheit der Abschätzung liegt in der teilweise sehr lückenhaften Datenlage, die zu hohen Sicherheitsfaktoren bei der PNEC-Abschätzung führt.

Da der Schwerpunkt des Projektes die Desinfektion von Naturteichen ist, dabei die Kalkung die wichtigste Methode ist und gleichzeitig zur Auswirkung erhöhter pH-Werte auf Makroinvertebraten in Fließgewässern anscheinend kaum Daten vorliegen, wurde vorgeschlagen, die Auswirkung pH-Werten zwischen 7 und 10 auf Fließgewässerorganismen zu untersuchen. Als Testsubstanz bietet sich Kalkmilch (Löschkalk) an, da auch bei der Verwendung von Branntkalk im Wasser Calciumhydroxid entsteht. Als weitere Testsubstanz wurde das Desinfektionsmittel Halamid®Chloramine T ausgewählt.

Als Stellvertreter für wichtige Invertebratengruppen der Nahrungskette in Fließgewässern wurden *Gammarus pulex* und die Eintagsfliege *Habrophlebia lauta* vorgeschlagen.

Die Literaturstudie ist dem Abschlussbericht beigelegt.

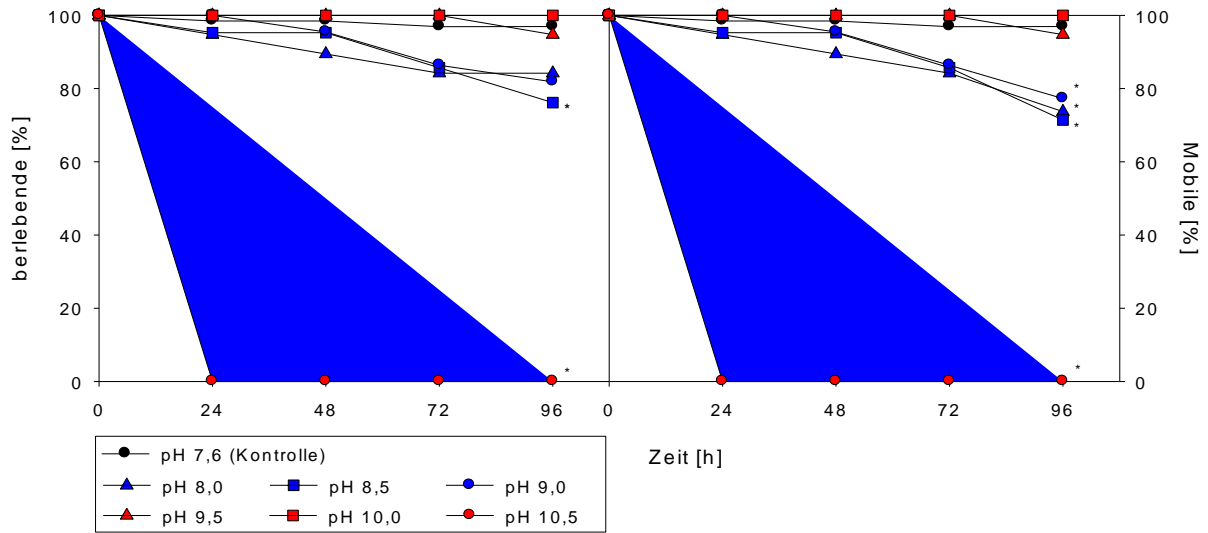
3.1.12 Ökotoxikologische Tests im Laborversuch

Auf Basis der Literaturstudie wurden ökotoxikologische Tests durchgeführt. Die Ergebnisse mit *Habrophlebia lauta* sind in Abbildung 22 und 23 dargestellt. Der Sauerstoffgehalt lag während des gesamten Testverlaufs im unkritischen Bereich von 80-117% Sättigung und die Mortalität in den Kontrollen lag nach 96h bei 3%, Der pH-Wert in den Kontrollen und den Ansätzen mit Halamid®Chloramine T lag im Testverlauf ebenfalls im normalen Bereich zwischen 7,37 und 7,88. Die Tests erfüllten damit die internen Validitätskriterien. Die erhöhte Mortalität bzw. Immobilität der Larven in den Versuchsansätzen konnte eindeutig auf eine Wirkung der getesteten Substanzen zurückgeführt werden.

Bei den Ansätzen mit erhöhten pH-Werten durch CaO wurde in der höchste pH-Stufe von 10,5 eine Mortalität von 100% bereits nach 24h beobachtet. Die übrigen pH-Stufen zeigten keinen konzentrationsabhängigen Effekt. Hier reagierten die niedrigeren pH-Stufen von 8,0 – 9,0 sensitiver als die beiden pH-Stufen 9,5 und 10,0.

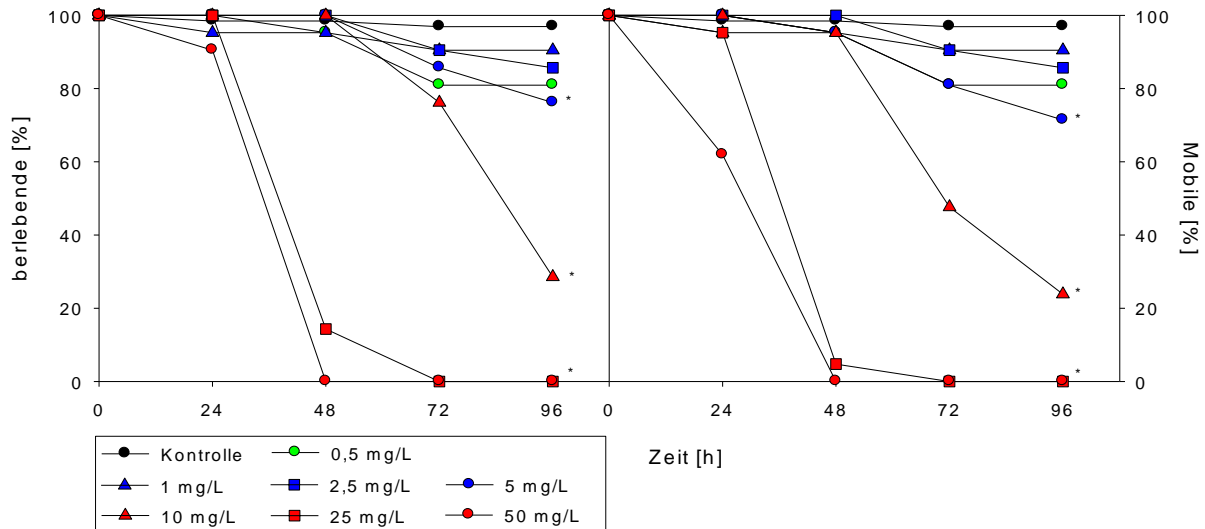
Die Testung von Halamid®Chloramine T ergab einen deutlich konzentrationsabhängigen Effekt der vier obersten Konzentrationen (5-50 mg/L). Der Effekt war besonders ausgeprägt ab der Konzentrationsstufe 10mg/L. Die EC50, sowie LOEC und NOEC sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

Abbildung 22: %-Anteil überlebender (links) und mobiler (rechts) *Habrophlebia lauta* in den Testansätzen mit CaO.



*signifikanter Unterschied zur Kontrolle (Log-Rank-Test: $p < 0,001$, Mehrfachvergleich nach Holm-Sidak mit Signifikanzlevel 0,05)

Abbildung 23: %-Anteil überlebender (links) und mobiler (rechts) *Habrophlebia lauta* in den Testansätzen mit Halamid.



*signifikanter Unterschied zur Kontrolle (Log-Rank-Test: $p < 0,001$, Mehrfachvergleich nach Holm-Sidak mit Signifikanzlevel 0,05)

Tabelle 37: NOEC, LOEC und EC_{50} des ökotoxikologischen Tests mit *Habrophlebia lauta*

	CaO		Halamid® Chloramine T	
	Mortalität	Immobilität	Mortalität	Immobilität
EC_{50} (96h)	10,38	10,51	4,2 (0,4 – 33,6)	3,91 (0,3 – 31,6)
LOEC (96h)	8,5	n.d.	5	5
NOEC (96h)	8,0	n.d.	2,5	2,5

Die Ergebnisse der ökotoxikologischen Tests mit *Gammarus pulex* sind in Abbildung 24 und 25 dargestellt.

Die Mortalität der Kontrollgruppe lag bei 25% bzw. 15% im CaO-Ansatz und Halamidansatz. Die hohe Kontrollmortalität kann durch die suboptimalen Haltungsbedingungen im Vergleich zum Freiland erklärt werden. Der Sauerstoffgehalt lag im Testverlauf im Ansatz mit CaO im akzeptablen Bereich von 7,4 bis 8,8 mg/l, zumeist jedoch um 8,0 mg/l. Im Halamidansatz

schwankte der Sauerstoffgehalt zwischen 7,1 mg/l und 8,3 mg/l, meist lag er unter 8,0 mg/l. Der pH-Wert in den Kontrollen und in den Ansätzen mit Halamid lag zwischen 8,0 und 8,6. Die Ergebnisse nach Exposition mit Halamid zeigen konzentrationsabhängige Effekte mit einer EC50 (96h) von 9.2 mg/L und einer NOEC (96h) von 10 mg/L. Die pH (CaO)-induzierten Effekte führten zu einer EC50 (96h) von pH 9.3 und einer NOEC (96h) von pH 9.0 (Tabelle 38).

Abbildung 24: %-Anteil überlebender *Gammarus pulex* in den Testansätzen mit CaO.

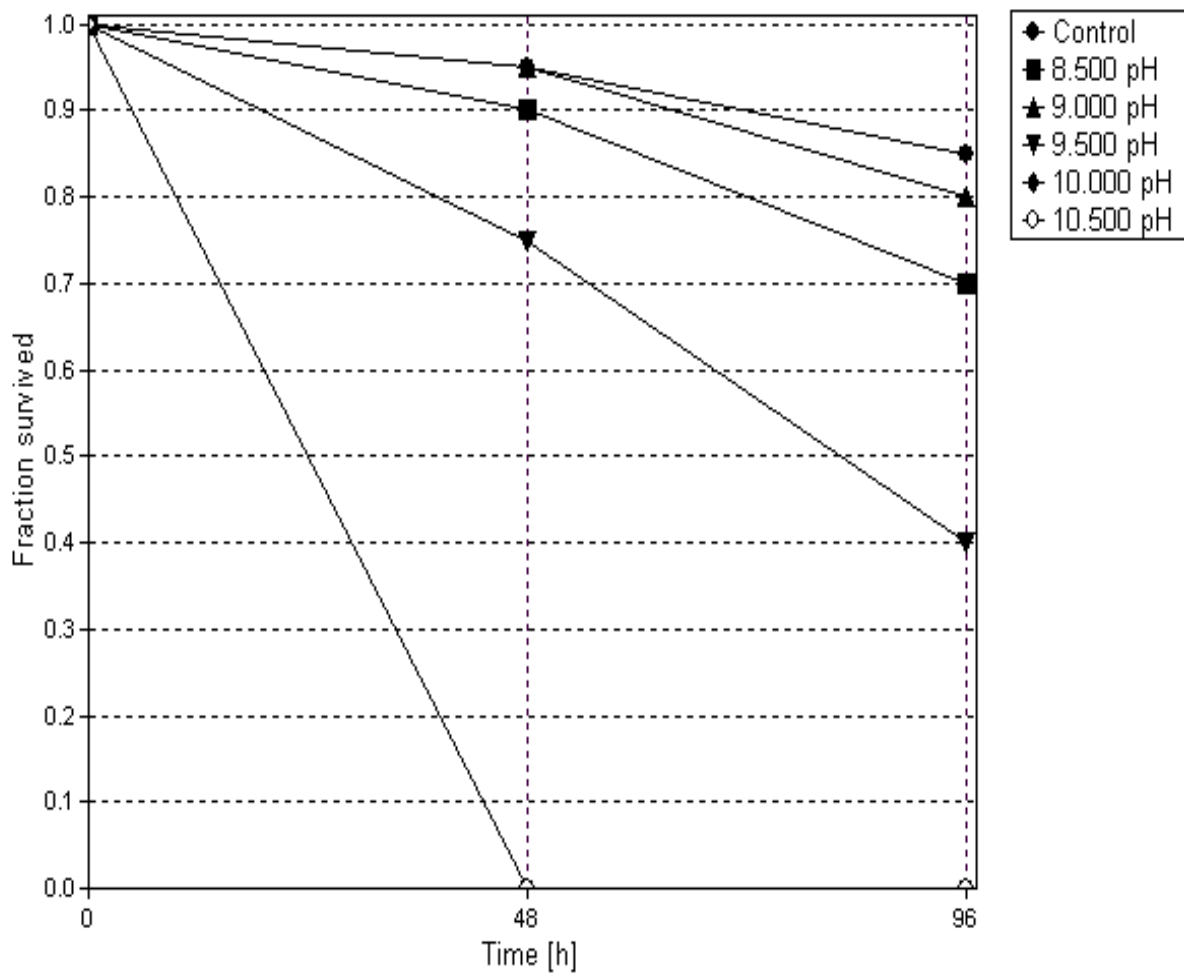


Abbildung 25: %-Anteil überlebender *Gammarus pulex* in den Testansätzen mit Halamid.

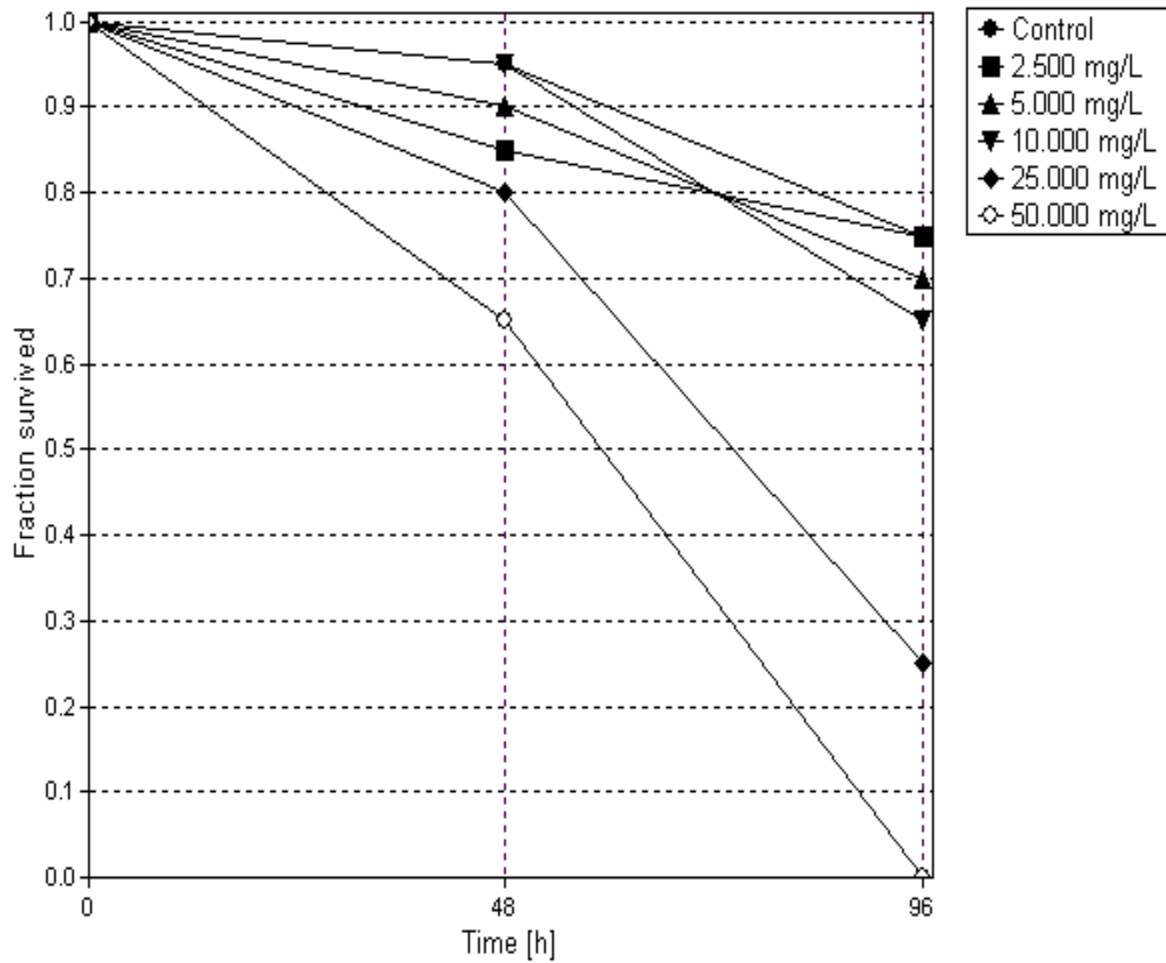


Tabelle 38: NOEC, LOEC und EC₅₀ der ökotoxikologischen Tests mit *Gammarus pulex*

	CaO	Halamid®Chloramine T
	Mortalität	Mortalität
EC ₅₀ (96h)	9.3 (8.7-9.8)	9.2 (6.3-13.3)
LOEC (96h)	9.5	25.0
NOEC (96h)	9.0	10.0

3.1.13 Ökologisches Monitoring in Teichanlagen

Die ökologischen Kenngrößen zur Gewässergüte der untersuchten Messstellen sind in Tabelle 39 dargestellt. Eine deutliche Beeinträchtigung der Lebensgemeinschaften auf Ebene dieser Kenngrößen konnte nicht festgestellt werden. Es kommt eher zu einer leichten generellen Verschlechterung der Güteklassen durch die Fischzuchtanlage selbst. Lediglich bei der Untersuchung der Anlage Kelp erhalten der Saprobienindex und das Modul Allgemeine Degradation nach Einleitung des Kalkwassers eine schlechtere Einstufung. Bei detaillierter Betrachtung der hier zugrunde liegenden Einzelergebnisse wird jedoch deutlich, dass dies nicht den tatsächlichen Gegebenheiten entspricht, sondern vielmehr natürliche Schwankungen im Bereich der Klassengrenze zu Veränderungen der Zustandsklasse führen.

Tabelle 39: Ökologische Zustandsklassen der Module Saprobie und Allgemeine Degradation der Probenahme vor und nach Ablassen der Versuchsteiche

Anlage		Kentheim			Landkreis Calw				Kelp			Vollmer			Drafehn		
Gewässer		Rötelbach			Würzbach				Würzbach			Kleine Enz			Schüttelbach		
Gewässertyp		5.1			5.1				5.1			5.1			5		
		Messstelle			Messstelle				Messstelle			Messstelle			Messstelle		
Gewässergüteklasse		oh	E	uh	oh	E	uh1	uh2	oh	E	uh	oh	E	uh	oh	E	uh
Saprobie	vor	1	2	2	1	1	2	-	2	2	1	2	2	2	2	2	2
	nach		1	2		1	2	-		2	2		2	2		2	2
Allgemeine Degradation	vor	2	2	2	1	2	3	-	3	3	2	4	4	3	3	4	4
	nach		2	2		2	3	-		3	3		4	3		4	4

(1 – sehr gut, 2 – gut, 3 – mäßig, 4 – ungenügend, 5 – schlecht. Gewässertypen: 5.1 = feinmaterialreicher, silikatischer Mittelgebirgsbach, 5 = grobmaterialreicher, silikatischer Mittelgebirgsbach)

Zur Beurteilung der tatsächlich auftretenden Veränderungen innerhalb der Biozönose wurden darüber hinaus die Artenlisten und absoluten Abundanzen der gefundenen Taxa sowie einige für die Artenzusammensetzung aussagekräftige Maßzahlen verglichen (Tabelle 40). In der Tabelle sind Abweichungen, die über die normalen zu erwartenden Schwankungen hinausgehen dargestellt. Daher sind auch lediglich die Taxa dargestellt, die einigermaßen abundant vorgefunden wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Einleitung von Teichwasser mit deutlich erhöhtem pH-Wert größtenteils keinen direkten Effekt nach sich zieht. Es kommt zu keinen deutlichen, einheitlichen Veränderungen in der Gesamtbiozönose. Vereinzelt kann eine Abnahme der Individuendichten, vor allem bei Artengruppen, die ein größeres

Driftpotenzial besitzen, festgestellt werden. Langzeiteffekte sind auf der Basis dieser Ergebnisse nicht zu erwarten.

Im Rahmen der Untersuchung der Zuchtanlage Berger wurden weder an der Einleitstelle noch an der ersten Probenahmestelle weiter unterhalb Veränderungen der Lebensgemeinschaften durch Entleerung des Versuchsteichs gefunden. Die Biozönosen waren zu beiden Zeitpunkten an beiden Stellen nahezu identisch. Unterschiede in der Artenzusammensetzung und der Abundanzstruktur liegen im normalen Schwankungsbereich für Untersuchungen des Makrozoobenthos im Mittelgebirge. Daher wurde auch darauf verzichtet, die Makrozoobenthosproben der Probenahmestelle unterhalb 2 weiter auszuwerten. Mögliche Abweichungen wären hier nicht auf die Einleitung zurückzuführen gewesen. Der erhöhte pH-Wert von 10,4 bis knapp 11 über 5 Stunden zeigt damit keine negativen Effekte auf die Makrozoobenthosbesiedlung im Würzbach. Gleiches gilt für die kleine Enz an der Fischzuchtanlage Vollmer und den Rötelbach bei Kentheim. Auch hier wurden keine Veränderungen der Zönose gefunden, die nicht im normalen durch die Probenahme bedingten Schwankungsbereich liegen.

Der Versuch an der Teichanlage Kelp führte zur Reduktion der Abundanz einiger Ephemeroptera- und Dipterataxa sowie der Gammariden. Es handelt sich hier insgesamt um Arten, die ein hohes Driftpotenzial aufweisen. Der erhöhte Stress durch den äußerst lange anhaltenden pH-Anstieg auf Werte über 10 führte damit offensichtlich zur Abwanderung von Teilpopulationen. Die Gesamtabundanz wurde dabei aber jeweils nur soweit reduziert, dass eine Wiedererholung durch normale kontinuierlich stattfindende Driftbewegungen sehr wahrscheinlich ist. Bei der Zusatzuntersuchung im Folgejahr entsprach die Biozönose im Rahmen der natürlich auftretenden Schwankungen hinsichtlich Artenzusammensetzung und Abundanz denjenigen aus 2012. Es ist sogar wahrscheinlich, dass sich die durch Drift ausgedünnten Populationen innerhalb einer Zeitspanne von wenigen Tagen durch Zuwanderung wieder vollständig erholt haben.

Der Versuch in der Anlage Drafehn kam zu ähnlichen Ergebnissen. Hier wurden nach Einleitung des gekalkten Wassers für die Chironomiden und die Eintagsfliege *Serratella ignita* erneut deutlich reduzierte Dichten (> 50 %) nachgewiesen. Die Abundanz zum Zeitpunkt der zweiten Untersuchung lag allerdings für die meisten betroffenen Taxa noch so hoch, dass durch die Probenahme bedingte Schwankungen nicht ausgeschlossen werden können. Eine nachhaltige Beeinträchtigung kann auch hier zweifelsfrei ausgeschlossen werden.

Tabelle 40: Veränderung der Lebensgemeinschaften durch die Einleitung von Kalkwasser

	Berger	Kelp	Drafehn	Kentheim	Vollmer
Metrics					
Abundanz (Ind/m ²)	++ / ++	- / +	- / o	-- / -	o / o
N Taxa	o / o	o / o	(-) / o	o / o	o / (+)
SI (Saprobienindex)	o / o	- / (+)	o / o	o / o	o / o
Diversität (Shannon-Wiener, Simpson, Evenness)	(-) / (-)	o / o	(+) / (+)	(+) / +	(+) / (+)
GFI (German Fauna Index Typ 5)	o / o	o / o	(-) / o	o / (+)	o / +
Abundanz in den taxonomischen Gruppen					
Ephemeroptera					
Baetidae	++ / ++	-- / ++	(-) / (-)	o / o	o / o
<i>Serratella ignita</i>		o / --	-- / -		o / o
others	o / o	o / o	o / o	o / o	o / o
Trichoptera	o / o	(-) / (-)	o / o	o / o	o / o
Plecoptera	o / o	o / o	o / o	o / o	o / o
Diptera					
Chironomidae	o / o	- / o	-- / --	(-) / o	- / +
others	o / o	o / o	o / o	o / o	o / o
Crustacea (Gammarus)	o / o	-- / (-)	o / o	- / -	o / o
Turbellaria	o / o	o / o	o / o	- / -	o / o
others	o / o	o / o	o / o	o / o	o / o

Erläuterung zu Tabelle 40

- ++ deutliche Zunahme > 50%
- + Zunahme > 25%
- (+) tendenzielle Zunahme
- o keine Veränderung
- (-) tendenzielle Abnahme
- Abnahme > 25%
- deutliche Abnahme > 50%
- Taxon nicht vorhanden
- / PNS Ablauf / PNS unterhalb Anlage

Insgesamt ist festzuhalten, dass keines der im Rahmen des Projekts durchgeführten Monitorings nachhaltige negative Effekte durch die Einleitung von Kalkwasser mit einer daraus resultierenden deutlichen Erhöhung des pH-Werts im unterhalb liegenden Gewässer finden konnte. Sämtliche Veränderungen der Abundanzverhältnisse liegen entweder im normalen Schwankungsbereich der Probenahme oder sind kurzfristige Drifteffekte, die innerhalb kurzer Zeit wieder ausgeglichen wurden. Es bleibt jedoch zu beachten, dass es sich bei den hier dargestellten Untersuchungen lediglich um eine kleine Stichprobe, noch dazu überwiegend im gleichen Gewässertyp im Nordschwarzwald handelt. Die Versuche besitzen

eine gute Vergleichbarkeit, jedoch lassen sich die Ergebnisse auf andere Gewässertypen nur bedingt übertragen.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

In der Tierseuchenbekämpfung spielen Desinfektionsverfahren sowohl im Rahmen der allgemeinen Tierseuchenprophylaxe als auch im Zusammenhang mit dem eigentlichen Seuchenausbruch eine zentrale Rolle. Fortlaufende Desinfektionsmaßnahmen und die sog. Schlusdesinfektion sind essentiell, um die Ausbreitung einer Tierseuche zu unterbinden und den Tierbestand für eine Weiternutzung in der Zukunft wieder herzustellen. Der Erfolg der Desinfektionsverfahren muss dabei in jedem Fall gewährleistet sein und wird vom zuständigen Amtstierarzt verantwortet. Für diese Aufgabe werden klare Richtlinien und Empfehlungen benötigt, um so die Arbeit der Tierärzte vor Ort zu optimieren.

Im Zusammenhang mit Ausbrüchen von Fischseuchen in naturnahen Teichanlagen sind dabei einige Herausforderungen zu berücksichtigen:

1. Nur eine beschränkte Anzahl von Verfahren und Wirkstoffen sind für den Einsatz in naturnahen Teichanlagen verfügbar und zugelassen.
2. Die in naturnahen Teichanlagen anzutreffenden Matrices sind sehr heterogen und häufig nicht leicht zu reinigen und zu desinfizieren (unregelmäßige, offene Oberflächen, Wasser, Schlamm etc.).
3. Bei einer Desinfektion im naturnahen Bereich sind besondere Anforderungen an die Umweltverträglichkeit des Desinfektionsverfahrens zu stellen.

Vor diesem Hintergrund wurde das vorliegende Forschungsprojekt bearbeitet. Ziel dieses Projektes war es, durch die Kombination von standardisierten Laborversuchen und natur- und praxisnahen Freilandversuchen eine valide Basis für die Ableitung von Empfehlungen für die Desinfektion von naturnahen Teichanlagen im Falle von Ausbrüchen von viralen anzeigepflichtigen Fischseuchen (VHSV, KHV, IHNV) zu schaffen. Ein weiterer Arbeitsschwerpunkt lag in der Beurteilung der Desinfektionsmaßnahmen hinsichtlich der Umweltverträglichkeit.

Auf Basis der erarbeiteten Daten sind zum jetzigen Stand der Erkenntnisse für folgende Bereiche Empfehlungen abzuleiten, i.e. Desinfektion der Teichanlagen, Verwendung von Desinfektionsmitteln bei Ausbruch von Fischseuchen, Resistenzen und Sensitivitäten der untersuchten Fischviren gegenüber verschiedenen pH-Bedingungen, Trocknung und Wärme sowie zur Umweltverträglichkeit von Desinfektionsmaßnahmen in naturnahen Teichanlagen.

Betrachtet man die durchschnittlich errechneten D90-Werte der Laborteichversuche für alle drei Testviren (HVAV, KHV, VHSV) und verschiedene Testmilieus (Wasser, Sediment), so bewegen sich diese in einem Bereich von 1-5 Tagen. Auf der Basis dieser Daten dauert es

also zwischen 4 und 20 d, um eine vorhandene Virusausgangsmenge um 99,99 % zu reduzieren. Dieser Wert gilt in Analogie zu den Prüfrichtlinien für die viruzide Wirkung von Desinfektionsmitteln und -verfahren (DVG) als Basis für eine erfolgreiche Desinfektionsmaßnahme. Dabei zeigte sich eindeutig, dass unterschiedliche Sedimentarten in den Laborteichen einen Einfluss auf die Effizienz und Dauer der Inaktivierungsprozesse ausüben. Interessanterweise ergaben sich für das standardisierte künstliche Laborsediment kürzere Inaktivierungszeiten als für die beiden naturnahen Sedimente. Daraus kann man ableiten, dass für eine praxisnahe Beurteilung der für den Erfolg der Felddesinfektion entscheidenden Parameter die Verwendung von natürlichen Sedimenten in Laborteichversuchen wertvoller ist.

Der Vergleich der Ergebnisse aus den drei Feldversuchen mit VHSV-Feldisolaten (Ausbruchsisolate) mit den Ergebnissen mit dem Referenzvirus VHSV 1087 im Laborversuch zeigte, dass in allen Fällen bei den Feldviren unter Freilandbedingungen kürzere Inaktivierungszeiten bei einer Desinfektion mit Branntkalk pH 12 zu beobachten waren, i.e. in allen Fällen war eine erfolgreiche Inaktivierung der Ausbruchsvirus-Isolate mit Branntkalk und einem pH-Wert von 12 in den verschiedenen Substraten schon nach 2-4 d möglich. In allen Laborteichversuchen konnte gezeigt werden, dass mit der Verwendung von Löschkalk anstelle von Branntkalk bei pH 12 ein Desinfektionserfolg für alle getesteten Fischviren möglich war. Dazu waren aber im Vergleich zur Verwendung von Branntkalk längere Inaktivierungszeiten nötig. Diese Ergebnisse sollten allerdings noch in entsprechenden Freilandversuchen bestätigt werden. Dennoch lässt sich von diesen Beobachtungen folgendes ableiten:

- Die im Labor erarbeiteten Parameter zur Beurteilung des Desinfektionserfolgs im Freiland sind sehr wertvoll, aussagekräftig und übertragbar.
- Es ist also mit hoher Sicherheit möglich, auf der Basis der Ergebnisse der Laborversuche Empfehlungen und praxisnahe Arbeitsanweisungen zu erarbeiten. Dabei sollte aber trotz der in diesem Projekt gemachten Erkenntnisse, immer eine Integration von gewissen Sicherheitsmargen Bestandteil der Vorgehensweise sein.
- Bei Desinfektionsverfahren im Rahmen eines Fischseuchenausbruchs unter Praxisbedingungen vor Ort spielen immer auch Einflussfaktoren eine Rolle, die zum einem unter Laborbedingungen nicht exakt simuliert und standardisiert werden können, zum anderen aber den Desinfektionserfolg sowohl negativ als auch positiv beeinflussen können (UV-Strahlung, Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Art und Beschaffenheit des Teichschlammes etc.).

- Eine Desinfektion von naturnahen Teichanlagen ist auch mit Löschkalk bei einem pH-Wert von 12 erfolgreich, allerdings muss die Dauer der Desinfektionsmaßnahme entsprechend angepasst werden.

Von den Ergebnissen dieses Projektes bezüglich der Verwendung von Desinfektionsmitteln im Bereich von Fischzuchten lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

- Eine Desinfektion der untersuchten Fischviren (VHSV, KHV, HVAV) ist in allen Fällen möglich.
- Alle drei Fischviren können mit Ameisensäure in einem Temperaturbereich zwischen 4 °C und 20 °C desinfiziert werden. Für einen sicheren Desinfektionserfolg im Temperaturbereich zwischen 4 °C und 20 °C sind dabei eine Konzentration von 1 % und eine Mindesteinwirkzeit von 30 min nötig.
- Formalin eignet sich nicht für eine Desinfektion des Koi-Herpesvirus. VHSV (Novirhabdovirus) kann mit einer 1 %-igen Formalinlösung über einen Temperaturbereich von 4 °C bis 20 °C mit einer Mindesteinwirkzeit von 30 min desinfiziert werden.
- Verwendet man quaternäre Ammoniumverbindungen zur Desinfektion, kann ein Desinfektionserfolg für das VHSV im Temperaturbereich zwischen 4 °C und 10 °C mit einer Konzentration von 0,25 % und einer Einwirkungszeit von mindestens 2 h erreicht werden. Das KHV wird mit einer Konzentration von 0,05-0,1 % bei Temperaturen zwischen 10 °C und 20 °C sowie einer Mindesteinwirkzeit von 2 h desinfiziert.
- Kalkmilch (pH 12) und Povidon-Iod (0,25 %) zeigten in der Hauptprüfung nach DVG-Prüfrichtlinien im Temperaturbereich zwischen 4 und 20 °C keine desinfizierende Wirkung auf KHV, HVAV und VHSV.
- Peressigsäure (0,05 %) kann im Temperaturbereich zwischen 4 °C und 20 °C bei einer Mindesteinwirkzeit von 15 min zur Desinfektion von VHSV verwendet werden. KHV kann mit Peressigsäure (0,05 %) nur bei 10 °C und einer Einwirkzeit von mindestens 30 min inaktiviert werden.

Aus den Ergebnissen des Forschungsprojektes können außerdem Aussagen über die pH-Sensitivität der Fischviren abgeleitet werden. Alle getesteten Viren zeigen eine Resistenz gegenüber pH 10 und teilweise gegen pH 11. Eine Desinfektionsmaßnahme, die ihre Wirkung über eine Erhöhung des pH-Wertes erzielt (Kalkbehandlung) sollte deshalb immer darauf ausgerichtet sein, dass der pH-Wert mindestens auf pH 12 erhöht wird. Unter diesen Bedingungen ist sowohl unter Verwendung von Branntkalk als auch NaOH oder Ca(OH)₂

eine erfolgreiche Desinfektion der Fischviren möglich. Die Dauer der Einwirkungszeit ist dabei auf die jeweilige Situation (Teichanlage, Wasser, Sediment, Geräte) und die zur pH-Erhöhung verwendete Chemikalie einzeln zu betrachten. Für diese Analyse und die Festlegung der geeigneten Desinfektionsparameter bieten die in diesem Forschungsprojekt durchgeführten Arbeiten und ihre Ergebnisse eine sehr valide und wertvolle Grundlage.

Ein weiterer wichtiger Aspekt des Projektes war die Untersuchung der Tenazität der untersuchten Fischviren in verschiedenen Matrices und gegenüber Trocknung und Wärme.

Diese Untersuchungen ergaben, dass die Viren bei einer Temperatur von 20 °C im Wasser eine geringere Tenazität haben als bei niedrigeren Temperaturen. Die Ergebnisse für die Tenazität im Teichschlamm waren gegensätzlich. Hier führte eine Temperatur von 20 ° zu einer gewissen Stabilisierung der Viren. Diese Ergebnisse müssen zusammen mit den Resultaten der Desinfektionsmittelprüfung bei der Desinfektion vor Ort berücksichtigt werden.

Alle untersuchten Viren haben eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Trocknung. Die getesteten Fischviren wurden durch Trocknung innerhalb von 60-90 min inaktiviert. Deshalb ist es sinnvoll, dass man bei der Durchführung der Desinfektionsmaßnahmen im Falle eines Fischseuchenausbruchs diese Eigenschaft der verursachenden Viren ausnützt.

Eine thermische Desinfektion der untersuchten Fischviren ist bei einer Temperatur von mehr als 40 °C möglich. Stellt sich ein Desinfektionserfolg bei 40 °C für alle untersuchten Viren nach ca. 2-3 h ein, so reduziert sich diese Zeit bei 55 °C auf ca. 10 min und bei 70 °C sogar auf ca. 5-7 min.

In keinem der im Rahmen des Projekts durchgeführten Monitorings konnte man nachhaltige negative Effekte durch die Einleitung von Kalkwasser mit einer daraus resultierenden deutlichen Erhöhung des pH-Werts im unterhalb liegenden Gewässer finden. Sämtliche Veränderungen der Abundanzverhältnisse liegen entweder im normalen Schwankungsbereich der Probenahme oder sind kurzfristige Drifteffekte, die innerhalb kurzer Zeit wieder ausgeglichen sind. Es bleibt jedoch zu beachten, dass es sich bei den hier dargestellten Untersuchungen lediglich um eine kleine Stichprobe, noch dazu überwiegend im gleichen Gewässertyp im Nordschwarzwald handelt. Die Versuche sind damit gut zu vergleichen, die Ergebnisse auf andere Regionen oder Gewässertypen allerdings nur bedingt übertragbar.

Beim Einsatz von Branntkalk tritt die desinfizierende Wirkung durch eine Erhöhung des pH-Wertes im Teichwasser auf pH12 ein. Erst nach signifikanter Absenkung des pH-Wertes (pH8.5) darf das behandelte Wasser in ein umliegendes Gewässer abgeleitet werden. H. lauta scheint wenig sensitiv gegenüber einer Erhöhung des pH-Wertes zu sein. Erste Effekte auf die

Überlebensrate wurden bei einem pH-Wert von 10.5 beobachtet. *G. pulex* zeigte im Vergleich eine höhere Sensitivität mit einer EC50 (96h) von pH9.3. Die für Desinfektionsmaßnahmen empfohlene Konzentration für Halamid® liegt bei 3 mg/L. Bei den Studien mit *H. lauta* ergab sich für Halamid® eine EC50 (96h) von 4.2 mg/L, die deutlich niedriger lag als der für *G. pulex* ermittelte Wert (9.2 mg/L). Unter Berücksichtigung der Verdünnung im Vorfluter wird der fachgerechte Einsatz von Halamid® und Branntkalk wahrscheinlich zu einem begrenzten Risiko für aquatische Makroinvertebraten führen.

Die Ergebnisse des durchgeführten Projektes wurden und werden in schriftlicher sowie mündlicher Form den Amtstierärzten mitgeteilt. Aus dem Forschungsprojekt resultieren maßgebliche theoretische und experimentelle Erkenntnisse, die zur weiteren Verbesserung der Effizienz, Praktikabilität und Umweltverträglichkeit von Desinfektionsverfahren in naturnahen Teichanlagen sowohl im Bereich der fortlaufenden, prophylaktischen Desinfektion als auch im Falle eines Ausbruchs einer Fischseuche kurz- und mittelfristig beitragen werden. Ein weiterer Nutzen des Projektes liegt darin, dass die Erkenntnisse Eingang in die Desinfektionsrichtlinie entsprechend § 7 des Tiergesundheitsgesetzes finden können. Eine direkte Umsetzung der Projektergebnisse als Empfehlungen für Desinfektionsverfahren in naturnahen Teichanlagen beim Ausbruch von Fischseuchen ist gegeben. Diese Empfehlungen betreffen zum einen die Teichanlage als solche, aber auch Gerätschaften und Gegenstände, die potentiell mit den Fischviren kontaminiert sind.

Nichtsdestotrotz besteht noch weiterer Forschungsbedarf in der Validierung der Übertragbarkeit von generierten Labordaten auf die Situation der Wirksamkeit der Methoden im Vor-Ort-Versuch und somit im Falle eines Fischseuchenausbruches. Dies gilt v.a. für diejenigen Fischviren, die anzeigepflichtige Fischseuchen verursachen und Bestandteil dieses Projektes waren, für die aber in den vorliegenden Projektarbeiten nur Labordaten generiert wurden. Versuche unter Feldbedingungen konnten nur für das VHSV durchgeführt werden. Deshalb wird es in Zukunft sehr wichtig sein, dass bei Ausbrüchen von Fischseuchen, die durch die anderen im Projekt zu bearbeitenden Viren verursacht werden, analog zum VHSV durchgeführte Feldanalysen in den Ablauf der Seuchenbekämpfung integriert werden. Die Basis dafür wurde durch die in diesem Projekt erarbeiteten und validierten Methoden geschaffen.

Die Eignung des Surrogatvirus HVAV für die Ableitung von Aussagen über die Desinfektionsverfahren für das KHV kann auf der Basis der vorliegenden Daten gegenwärtig nicht abschließend beurteilt werden. Es zeigte sich jedoch, dass sich das KHV-T z.B. in den Laborteichversuchen regelmäßig widerstandsfähiger als das Surrogatvirus HVAV 110 erwies.

Aufgrund der engen verwandtschaftlichen Beziehung und vergleichbaren biologischen Charakteristika von VHSV und IHNV (beide sind Vertreter des Genus *Novirhabdovirus*) ist mit hoher Sicherheit davon auszugehen, dass sich VHSV und IHNV in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Desinfektionsmittel und den davon abgeleiteten Desinfektionsverfahren sehr stark ähneln. Deshalb ist es zum jetzigen Stand der Untersuchungen möglich, die Empfehlungen für das VHSV auch auf das IHNV zu übertragen. Es ist jedoch zweifellos nötig, dass zumindest bestimmte, für die Desinfektion von VHSV als relevant anzusehende Eckwerte auch für das IHNV durch Labor- und Freilandversuche weiter validiert werden.

Eine Zielgröße des Projektes war die Untersuchung der Umweltrelevanz von naturnahen Desinfektionsverfahren. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen sind äußerst wertvoll für die Beurteilung der Umweltverträglichkeit und somit der Nachhaltigkeit des Desinfektionsverfahrens. Ziel einer jeden Desinfektionsmaßnahme sollte es sein, Krankheitserreger effektiv zu inaktivieren ohne dabei Schäden an anderen zu schützenden Gütern (Mensch, Umwelt, Natur) zu verursachen. Dieses Bestreben ist auch eine der Grundlagen der seit 01.09.2013 in Kraft getretenen Biozid-Verordnung (Verordnung (EU) Nr. 528/2012), die die Bereitstellung auf dem Markt (Zulassung) und Verwendung von Biozidprodukten und somit auch Desinfektionsmitteln regelt.

In der Tabelle 41 sind die für die verschiedenen Viren untersuchten Desinfektionsmethoden, ihre erfolgreiche Wirkung und die entsprechenden Randbedingungen in der Übersicht dargestellt.

Tabelle 41: Übersicht über die Wirkung der untersuchten Desinfektionsmittel und –methoden unter Berücksichtigung der verwendeten Testsysteme und Testbedingungen

Fischseuchen (Erreger)	Desinfektion bzw. Desinfektionsmittel (Wirkstoffgruppe)	Testsystem	Anwendungsbereich/ Materialien	Konzentration [%] bzw. pH Wert	Temperatur-Einwirkzeit (mind.)
Virale Hämorrhagi-sche Septikämie (VHS Virus)	Ameisensäure (organische Säuren)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Flüssigkeiten	0,5 – 1,0 %	4-20°C Wirkung nicht ausreichend
		Keimträgertest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	0,5 % 1,0 %	4 - 10°C, 2 h 20°, 15 min 4 - 20°C, 15 min
	Formalin (Aldehyde)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Flüssigkeiten	1,0 % 3,0%	4 - 20°C, Wirkung nicht ausreichend 20°C, 1 h 4-10°C, Wirkung nicht ausreichend
		Keimträgertest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte, betonierter Teich)	1,0	4 – 20°C, 30 min
	Didecyl-dimethylammonium-chlorid (Quarternäre Ammoniumverbindun-gen)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Flüssigkeiten	0,1 – 0,25 %	4-20°C, Wirkung nicht ausreichend
		Keimträgertest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	0,25 %	4 – 10°C, 2 h Bei 20 °C unwirksam

Fischseuchen (Erreger)	Desinfektion bzw. Desinfektionsmittel (Wirkstoffgruppe)	Testsystem	Anwendungsbereich/ Materialien	Konzentration [%] bzw. pH Wert	Temperatur-Einwirkzeit (mind.)
-------------------------------	--	-------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------

Virale Hämorrhagi-sche Septikämie (VHS Virus)	Peressigsäure (Peroxidverbindungen)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie Keimträgerstest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Flüssigkeiten Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	0,025 – 0,05% 0,05	4-20°C, Wirkung nicht ausreichend 4 - 20°C, 15 min
	Kalkmilch (Ca(OH) ₂)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Flüssigkeiten	pH 12	4 - 20°C Wirkung nicht ausreichend
		Keimträgerstest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	pH 12	4 - 20°C Wirkung nicht ausreichend
	Povidon-Iod (Polyvinylpyrrolidone-Iod-Komplex; Iod-Verbindung)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Flüssigkeiten	0,1 – 0,25	4 - 20°C Wirkung nicht ausreichend
		Keimträgerstest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	0,25	4 - 20°C, 2 h
Trocknung	Trocknung auf Keimträgern	Oberflächen, Gerätschaft		Wirkung nicht ausreichend	
Wärme	Suspensions-versuch	Geräte, Behälter, Kleidung		40°C, 60 min 55°C, 10 min 70 °C, 5 min	

Fischseuchen (Erreger)	Desinfektion bzw. Desinfektionsmittel (Wirkstoffgruppe)	Testsystem	Anwendungsbereich/ Materialien	Konzentration [%] bzw. pH Wert	Temperatur-Einwirkzeit (mind.)
Virale Hämorrhagi-sche Septikämie (VHS Virus)	Branntkalk	Laborteich-Versuche mit Keimträgern	Wasser Teichoberfläche Sediment (3 cm Tiefe)	pH 11	23 Tage 11 Tage 24 Tage
			Wasser	pH 12	8 Tage

			Teichoberfläche Sediment (3 cm Tiefe)		4 Tage 28 Tage
		Feldversuche	Wasser Teichoberfläche Sediment (3 cm Tiefe)	pH 12	5 Tage 6 Tage 8 Tage
	Löschkalk	Laborteich-Versuche mit Keimträgern	Wasser Teichoberfläche Sediment (3 cm Tiefe)	pH 11	40 Tage 44 Tage 48 Tage
			Wasser Teichoberfläche Sediment (3 cm Tiefe)	pH 12	14 Tage 9 Tage 33 Tage

Fischseuchen (Erreger)	Desinfektion bzw. Desinfektionsmittel (Wirkstoffgruppe)	Testsystem	Anwendungsbereich/ Materialien	Konzentration [%] bzw. pH Wert	Temperatur-Einwirkzeit (mind.)
Koi-Herpes-Virusinfektion (KH Virus)	Ameisensäure (organische Säuren)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie Keimträgerstest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Flüssigkeiten Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	0,5 – 1,0 0,25 0,5	4-20°C Wirkung nicht ausreichend 4°C, 1 h 10–20°C, 30 min 4-10°C, 15 min 20°C, 30 min
	Formalin (Aldehyde)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie Keimträgerstest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Flüssigkeiten Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	1,0 – 3,0 1,0	4-20°C Wirkung nicht ausreichend 10-20°C, 2 h
	Didecyl-dimethylammonium-chlorid (Quarternäre Ammoniumverbindungen)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie Keimträgerstest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Flüssigkeiten Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	0,025 0,05 0,05 0,1	4-20°C, Wirkung nicht ausreichend 10°C, 15 min 10°C, 2 h 20°C, 1 h 10°C, 30 min

Fischseuchen (Erreger)	Desinfektion bzw. Desinfektionsmittel (Wirkstoffgruppe)	Testsystem	Anwendungsbereich/ Materialien	Konzentration [%] bzw. pH Wert	Temperatur-Einwirkzeit (mind.)
Koi-Herpes-	Peressigsäure	Suspensionstest gem.	Flüssigkeiten	0,025 – 0,05	4-20°C, Wirkung nicht

Virusinfektion (KH Virus)	(Peroxidverbindungen)	DVG Prüfrichtlinie Keimträgertest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	0,05	ausreichend 10°C, 30 min
	Kalkmilch (Ca(OH) ₂)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Flüssigkeiten	pH 12	10°C, 30 min
		Keimträgertest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	pH 12	4-20°C Wirkung nicht ausreichend
	Povidon-Iod (Polyvinylpyrrolidone-Iod- Komplex; Iod-Verbindung)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Flüssigkeiten	0,1 – 0,25	4, 20°C Wirkung nicht ausreichend
Keimträgertest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)		Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	0,25	4, 20°C, 2 h	
Trocknung	Trocknung auf Keimträgern	Oberflächen, Gerätschaft		Wirkung nicht ausreichend	

Fischseuchen (Erreger)	Desinfektion bzw. Desinfektionsmittel (Wirkstoffgruppe)	Testsystem	Anwendungsbereich/ Materialien	Konzentration [%] bzw. pH Wert	Temperatur-Einwirkzeit (mind.)
Koi-Herpes- Virusinfektion (KH Virus)	Wärme	Suspensionsver-such	Geräte, Behälter, Kleidung		40°C, 60 min 55°C, 10 min 70 °C, 5 min
	Branntkalk	Laborteich-Versuche mit Keimträgern	Wasser Teichoberfläche Sediment (3 cm Tiefe)	pH 11	13 Tage 10 Tage 23 Tage

			Wasser Teichoberfläche Sediment (3 cm Tiefe)	pH 12	6 Tage 11 Tage 17 Tage
	Löschkalk	Laborteich-Versuche mit Keimträgern	Wasser Teichoberfläche Sediment (3 cm Tiefe)	pH 11	18 Tage 11 Tage 22 Tage
			Wasser Teichoberfläche Sediment (3 cm Tiefe)	pH 12	6 Tage 6 Tage 11 Tage

Fischseuchen (Erreger)	Desinfektion bzw. Desinfektionsmittel (Wirkstoffgruppe)	Testsystem	Anwendungsbereich/ Materialien	Konzentration [%] bzw. pH Wert	Temperatur-Einwirkzeit (mind.)
<i>Herpesvirus anguillae</i> Infektion (HVA Virus) wurde als Surrogat-Virus für das KH-Virus verwendet	Ameisensäure (organische Säuren)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Flüssigkeiten	0,25 – 1,0	4-20°C, 15 min
		Keimträgerstest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	0,5 0,1	4°C, 1 h
	Formalin (Aldehyde)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Flüssigkeiten	3,0	4°C, 30 min
		Keimträgerstest gem. DVG Prüfrichtlinie (Hauptprüfung)	Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)	3,0	20°C, Wirkung nicht ausreichend
	Didecyl-dimethylammonium-chlorid (Quarternäre Ammoniumverbindungen)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Flüssigkeiten	0,05	10-20°C, 15 min
Peressigsäure (Peroxidverbindungen)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Flüssigkeiten	0,025	10-20°C, 15 min	
			0,05-0,1	4-20°C, 15 min	
			0,25 – 0,5	20°C, 30 min	

Fischseuchen (Erreger)	Desinfektion bzw. Desinfektionsmittel (Wirkstoffgruppe)	Testsystem	Anwendungsbereich/ Materialien	Konzentration [%] bzw. pH Wert	Temperatur-Einwirkzeit (mind.)
<i>Herpesvirus anguillae</i> Infektion	Kalkmilch (Ca(OH) ₂)	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Flüssigkeiten	pH 12	4-10°C, 15 min

(HVA Virus) wurde als Surrogat-Virus für das KH-Virus verwendet	Trocknung	Trocknung auf Keimträgern	Oberflächendesinfektion (u.a. Behältnisse, Tröge, Geräte)		Wirkung nicht ausreichend
	Wärme-Einwirkung	Suspensionstest gem. DVG Prüfrichtlinie	Geräte, Behälter, Kleidung		40°C, 60 min 55°C, 10 min 70°C, 5 min
	Branntkalk	Laborteich-Versuche mit Keimträgern	Wasser Teichoberfläche Sediment (3 cm Tiefe)	pH 12	3 Tage 3 Tage 11 Tage
	Löschkalk	Laborteich-Versuche mit Keimträgern	Wasser Teichoberfläche Sediment (3 cm Tiefe)	pH 12	5 Tage 5 Tage 11 Tage

Handlungsempfehlungen

A) Virale Hämorrhagische Septikämie der Salmoniden (VHS Virus)

Oberflächendesinfektion

Chemische Desinfektion, geeignete Desinfektionsmittel:

- Ameisensäure
- Formalin (35-37 % Formaldehyd)
- quarternäre Ammoniumverbindungen (QAV)
- Peressigsäure
- Kalkmilch bzw. Löschkalk ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)
- Branntkalk (CaO)

Flächendesinfektion, Oberflächen, Geräte, Tröge und betonierte Teichwände (chemisch):

- Ameisensäure: 1%, mindestens 15 min Einwirkzeit
- Formalin: 1%, mind. 30 min Einwirkzeit
- Didecyl-dimethylammoniumchlorid (QAV): 0,25%, mind. 2 h Einwirkzeit (nur zwischen 4-10°C)
- Peressigsäure: 0,05%, mind. 15 min Einwirkzeit

Diese Angaben beziehen sich auf einen Temperaturbereich von 4-20°C. Bei Abweichungen von diesem Temperaturbereich sind die Konzentrationen und Einwirkzeiten anzupassen.

Thermische Desinfektion: Wärmeeinwirkung 40°C, mind. 1 h; $\geq 55^\circ\text{C}$, mind. 10 min

Desinfektion von Teichanlagen oder Aquakulturanlage (naturnah):

Branntkalk und Löschkalk können zur Desinfektion von VHS-V in naturnahen Teichanlagen eingesetzt werden. Beim Einsatz von Löschkalk in den Laborteich-Versuchen war im Vergleich zu Branntkalk eine längere Wirkdauer notwendig, um die Virusausgangstiter um 99,99% zu senken.

Laborteichversuche haben zudem gezeigt, dass bei einem pH-Wert von 12 eine deutlich schnellere Desinfektionswirkung zu erwarten ist als bei pH 11. Wichtig ist daher eine

regelmäßige Kontrolle des pH-Werts während der Desinfektionsmaßnahme. Nach Befüllung der gekalkten Teiche mit Wasser müssen zweimal täglich pH-Messungen erfolgen. Bei einem Absinken des pH Wertes unter ist ein Nachkalken notwendig.

In den Feldversuchen betrug die Zeitdauer für eine Reduktion des Virusausgangstiter um 99.99% im Sediment (3 cm Tiefe) 8 Tage, auf der Teichoberfläche 6 Tage und im Wasser 5 Tage. Daher ist eine Aufrechterhaltung des pH-Werts bei 12 über die Zeitdauer von 8 Tagen zu empfehlen.

B) Koi-Herpes-Virusinfektion (Koi-Herpes-Virus, KHV)

Oberflächendesinfektion

Chemische Desinfektion, geeignete Desinfektionsmittel:

- Ameisensäure
- quarternäre Ammoniumverbindungen (QAV)
- Peressigsäure
- Branntkalk (CaO)

Flächendesinfektion, Oberflächen, Geräte, Tröge und betonierte Teichwände (chemisch):

- Ameisensäure: 0,25%, mind. 1 h Einwirkzeit bzw. 0,5% mind. 30 min Einwirkzeit
- Didecyl-dimethylammoniumchlorid (QAV): 0,1%, mind. 2 h Einwirkzeit
- Peressigsäure: 0,05%, mind. 30 min Einwirkzeit (nur im Temperaturbereich von 10°C)

Diese Angaben beziehen sich auf einen Temperaturbereich von 4-20°C. Bei Abweichungen von diesem Temperaturbereich sind die Konzentrationen und Einwirkzeiten anzupassen.

Zudem hat sich gezeigt, dass eine Trocknung nicht zu einer Reduzierung der Virusausgangstiter unter die Nachweisgrenze, aber zu einer deutlichen Reduktion der Virusausgangstiter führt.

Thermische Desinfektion: Wärmeeinwirkung 40°C, mind. 1 h; ≥55°C, mind. 10 min

Desinfektion von Teichanlagen oder Aquakulturanlage (naturnah):

Branntkalk und Löschkalk können zur Desinfektion von KHV in naturnahen Teichanlagen eingesetzt werden. Die Zeit war im Falle des KHV für eine Reduktion der Virusausgangstiter war beim Einsatz von Löschkalk in den Laborteich-Versuchen niedriger im Vergleich zu Branntkalk.

Laborteichversuche haben auch für das KHV gezeigt, dass bei einem pH-Wert von 12 eine deutlich schnellere Desinfektionswirkung zu erwarten ist als bei pH 11 sowohl für Brannt- als auch für Löschkalk. Wichtig ist daher eine regelmäßige Kontrolle des pH-Werts während der Desinfektionsmaßnahme. Nach Befüllung der gekalkten Teiche mit Wasser müssen zweimal täglich pH-Messungen erfolgen. Bei einem Absinken des pH Wertes unter ist ein Nachkalken notwendig.

C) Zusammenfassung der Empfehlungen zum Einsatz von Kalkformulierungen

Sollen VHS- und KH-Viren durch hohe pH-Werte sicher abgetötet werden, ist mindestens pH 12 nötig. Dieses Ergebnis konnte in verschiedenen voneinander unabhängigen Testansätzen (Laborteiche, verschiedene Chemikalien, Freilandversuche) bestätigt werden.

Bei Validierung der Verwendung von verschiedenen Kalkformulierungen (Branntkalk, Löschkalk) zur Desinfektion von Teichanlagen konnte sowohl im Laborversuch als auch in den Freilandversuchen der Desinfektionserfolg bei einem pH-Wert von 12 eindeutig nachgewiesen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass dieser über die gesamte Desinfektionsperiode durch Nachkalkung konstant gehalten werden muss. Bei der Untersuchung des Löschkalks als Alternative zum Branntkalk zeigte sich in allen Versuchen mit dem VHS-Virus, dass die Zeitspanne, die zu einer erfolgreichen Desinfektion führt, immer länger ist als bei der Verwendung von Branntkalk. Außerdem ist die Häufigkeit der benötigten Nachkalkungen erhöht. Eine Verringerung des pH-Wertes auf pH 11 während der Desinfektionsmaßnahme birgt gewisse Unsicherheiten in Bezug auf den Desinfektionserfolg und sollte im Zweifelsfall besser nicht durchgeführt werden. Signifikante Unterschiede bezüglich der Tiefenwirkung einer Desinfektion mit Brannt- bzw. Löschkalk konnten nicht beobachtet werden.

Alle untersuchten Viren zeigten eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Trockenheit. Daher ist die Trocknung eine wichtige zusätzliche Maßnahme, um eine erfolgreiche Desinfektion zu erreichen. Eine thermische Desinfektion ist ab 40 °C für alle untersuchten Viren möglich und die dafür benötigte Zeitspanne nimmt erwartungsgemäß mit zunehmender Temperatur ab.

Nachhaltige negative Effekte durch die Einleitung von Kalkwasser mit einer daraus resultierenden deutlichen Erhöhung des pH-Werts im unterhalb liegenden Gewässer wurden in den ökotoxikologischen Untersuchungen des Projekts nicht gefunden.

4 Zusammenfassung

Aufgabe und Ziel des Forschungsprojektes war es, Desinfektionsverfahren, die in naturnahen Fischteichen anwendbar sind, in Labor- und Freilandversuchen zu validieren und auf der Grundlage dieser wissenschaftlichen Ergebnisse, Empfehlungen für Desinfektionsmaßnahmen für spezifische Vor-Ort-Situationen zu entwickeln. Dabei war die Beurteilung der Umweltverträglichkeit der verschiedenen Maßnahmen ein wichtiger Bestandteil der Ziele.

Zu diesem Zweck wurden im Projekt drei verschiedene Fischseuchen verursachende Viren (virale hämorrhagische Septikämie-Virus: VHSV, infektiöse hämatopoetische Nekrose-Virus: IHNV, Koi-Herpesvirus: KHV) näher untersucht.

Im ersten Schritt des Projektes wurden für alle Viren geeignete und effiziente Zellkultursysteme etabliert, um dadurch hochtitrige Virussuspensionen als Grundlage für eine valide Beurteilung der Desinfektionsleistung von Inaktivierungsmethoden zu haben. Für die weitergehende Abschätzung der Inaktivierungspotenz der einzelnen Verfahren wurden zusätzlich als sog. Testkörper die einzelnen zu testenden Viren auf Sandwichkeimträger verbracht. Als Desinfektionsverfahren wurden thermische und chemische Methoden (pH-Wert, Desinfektionsmittel, Kalkformulierungen) sowie die Trocknung untersucht. Daneben wurde die in der Desinfektionsmittelrichtlinie vorgeschriebene Desinfektion mit Branntkalk bei einem pH-Wert von mindestens 12 unter Labor- und Freilandbedingungen evaluiert und mit möglichen Alternativen (Löschkalk, pH 11) verglichen.

Bei der Testung der Viren gegen insgesamt sechs Vertreter der in Desinfektionsmitteln verwendeten Wirkstoffen (organische Säuren, Aldehyde, quaternäre Ammoniumverbindungen, Iodophore, Kalkmilch, Peroxide) zeigte sich, dass für eine erfolgreiche Desinfektion von VHSV und KHV auf z.B. Oberflächen (Geräte, Teichwände etc.) 1 %-ige Ameisensäure in einem Temperaturbereich von 4-20 °C und einer Mindesteinwirkungszeit von 30 min verwendet werden kann. Die quaternären Ammoniumverbindungen sind prinzipiell ebenfalls für beide Viren geeignet. Unterschiede ergeben sich allerdings für den Temperaturbereich und die benötigten Konzentrationen: VHSV 4-10 °C, 0,25 %, 2h; KHV: 10-20 °C, 0,05-0,1 %, 2h. Peressigsäure in einer Konzentration von 0,05 % kann das VHSV innerhalb von 15 min zwischen 4 °C und 20 °C desinfizieren, das KHV dagegen nur bei 10 °C und einer Einwirkzeit von mindestens 30 min.

Formalin (1 %) zeigte nur für das VHSV eine desinfizierende Wirkung (4-20 °C, 30 min), nicht jedoch für das KHV. Keine erfolgreich Desinfektion war für beide Viren unter Verwendung von Kalkmilch (pH 12) und Povidon-Iod (0,25 %) im Temperaturbereich zwischen 4 °C und 20 °C möglich.

VHSV und KHV sind gegenüber einem pH-Wert von 3 sehr empfindlich. Sollen diese Viren durch hohe pH-Werte sicher abgetötet werden, ist mindestens pH 12 nötig. Dieses Ergebnis konnte in verschiedenen voneinander unabhängigen Testansätzen (Laborteiche, verschiedene Chemikalien, Freilandversuche) bestätigt werden.

Bei Validierung der Verwendung von verschiedenen Kalkformulierungen (Branntkalk, Löschkalk) zur Desinfektion von Teichanlagen konnte sowohl im Laborversuch als auch in den Freilandversuchen der Desinfektionserfolg bei einem pH-Wert von 12 eindeutig nachgewiesen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass dieser über die gesamte Desinfektionsperiode durch Nachkalkung konstant gehalten werden muss. Bei der Untersuchung des Löschkalks als Alternative zum Branntkalk zeigte sich in allen Versuchen, dass die Zeitspanne, die zu einer erfolgreichen Desinfektion führt, immer länger ist als bei der Verwendung von Branntkalk. Außerdem ist die Häufigkeit der benötigten Nachkalkungen erhöht. Eine Verringerung des pH-Wertes auf pH 11 während der Desinfektionsmaßnahme birgt gewisse Unsicherheiten in Bezug auf den Desinfektionserfolg und sollte im Zweifelsfall besser nicht durchgeführt werden. Unterschiede bezüglich der Tiefenwirkung einer Desinfektion mit Brannt- bzw. Löschkalk konnten nicht beobachtet werden.

Alle untersuchten Viren zeigten eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Trockenheit und konnten innerhalb von 60-90 min durch Trocknung sicher desinfiziert werden. Eine thermische Desinfektion ist ab 40 °C für alle untersuchten Viren möglich und die dafür benötigte Zeitspanne nimmt erwartungsgemäß mit zunehmender Temperatur ab (ca. 5-7 min bei 70 °C).

Nachhaltige negative Effekte durch die Einleitung von Kalkwasser mit einer daraus resultierenden deutlichen Erhöhung des pH-Werts im unterhalb liegenden Gewässer wurden nicht gefunden. Sämtliche Veränderungen der Abundanzverhältnisse liegen entweder im normalen Schwankungsbereich der Probenahme oder sind kurzfristige Drifteffekte, die innerhalb kurzer Zeit wieder ausgeglichen sind. Auf Basis dieser Ergebnisse kann für die Ökotoxikologie der Desinfektion in naturnahen Teichanlagen in Kombination mit den Laborarbeiten und der Literaturstudie festgestellt werden, dass das Risiko für die Umwelt im Falle einer Desinfektion im Fischseuchenfall als eher gering anzusehen ist.

Die in diesem Projekt erarbeitenden Ergebnisse und Methoden stellen eine sehr gute Basis für die Erarbeitung von Empfehlungen und für weitergehende Untersuchungen zur Desinfektion von Fischviren dar.

5 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Zunächst ist festzustellen, dass trotz einiger Schwierigkeiten (Personalbesetzung, beschränkte Zahl von möglichen Feldversuchen, technische Probleme bei der Virusvermehrung im Labor) die erarbeitenden Daten aufgrund ihrer Validität und Aussagekraft eine Ableitung von Empfehlungen für Desinfektionsverfahren im Rahmen von Ausbrüchen von anzeigepflichtigen Fischseuchen erlauben (siehe Abschnitt: Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse). Dies gilt natürlich primär für das die virale hämorrhagische Septikämie der Salmoniden verursachende VHS-Virus und für das Koi-Herpesvirus (KHV).

Im ursprünglichen Projektvorhaben sollten die Untersuchungen an folgenden Viren durchgeführt werden:

- Rhabdoviridae: Virale Hämorrhagische Septikämie-Virus (VHSV), Infektiöse Hämatopoetische Nekrose-Virus (IHNV)
- Herpesviridae: Koi-Herpesvirus (KHV)
- Birnaviridae: Infektiöse Pankreasnekrose-Virus (IPNV)

Mit Änderung des Projektvorhabens wurde das nicht mehr anzeige- bzw. meldepflichtige IPNV aus dem Projektvorhaben entnommen und dafür das Herpesvirus anguillae (HVA) als Surrogatvirus für das KHV mit aufgenommen. Für das IHNV wurden nur alle für die Vermehrung und Herstellung von Testkörpern nötigen Labormethoden etabliert und einige Untersuchungen zur Wärmeinaktivierung durchgeführt.

Aufgrund der engen Verwandtschaft des IHNV zum VHSV (gleiches Genus: Novirhabdovirus) bieten die für das VHSV generierten Daten auch die Grundlage für die Ableitung von Empfehlungen für das IHNV. Dennoch müssen für dieses Virus in Zukunft noch ergänzende und bestätigende Labor- und Freilandversuche durchgeführt werden, die in diesem Forschungsprojekt geplant aber aufgrund der o.g. Gründe nicht durchgeführt werden konnten. Für diese Arbeiten wurden im vorliegenden Projekt, wie bereits erwähnt, alle grundlegenden Methoden wie die Herstellung von hochtitrigen Virussuspensionen und Sandwichkeimträgern bereits etabliert.

Die Teilaufgaben 1) Etablierung aller notwendigen Methoden zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsverfahren, 2) Herstellung hochtitriger Virussuspensionen und 3) Herstellung von Keimträgern mit hohen Virustitern für die Versuche wurden also wie geplant alle vier Viren (VHSV, IHNV, KHV, HVAV) durchgeführt.

Die Teilaufgabe 4) Feststellung der pH-Sensitivität aller Testviren war ursprünglich für die pH-Werte 3, 5, 7, 10, 11, 12 in drei verschiedenen Medien geplant. Die Teilaufgabe wurde auf die Testung der pH-Verschiebung bei drei unterschiedlichen Temperaturen (4 °C, 10 °C, 20 °C), sowie der Untersuchung des Verhaltens der Viren auf die pH-Verschiebung mit Löschkalk erweitert. Bei den bisherigen Versuchen hatte sich überraschenderweise herausgestellt, dass mehrere der untersuchten Viren relativ resistent gegen pH-Verschiebungen waren, insbesondere bei einem pH von 10 und 11. Um die Bedeutung dieser Ergebnisse unter praktischen Bedingungen besser zu evaluieren, wurden die Versuche zur pH-Stabilität bei erhöhten pH-Werten (pH 10, 11, 12) auch mit Sandwichkeimträger durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sind die Viren u. U. besser geschützt obwohl sie weiterhin der pH-Verschiebung ausgesetzt sind. Daneben wurde die Relevanz der Ergebnisse in Bezug auf Kalk untersucht, in dem die pH-Verschiebung ergänzend zu NaOH mit Löschkalk erreicht wurde. Dadurch konnte die Validität der Ergebnisse und somit die Basis für die Ableitung der Empfehlungen bzgl. der pH-Sensitivität erhöht werden.

Die Teilaufgabe 5) Entwicklung von Methoden für den Nachweis aller Testviren in 3 verschiedenen Matrices (Wasser, Teichschlamm, Erde) wurde mit Oberflächenwasser aus einer Aquakulturanlage im Landkreis Calw und dem Hohenheimer Eiszeitteich, sowie dem Teichschlamm aus einer Aquakulturanlage im Landkreis Calw mit HVAV und KHV bei den Temperaturen 4 °C, 10 °C und 20 °C mittels Kulturverfahren durchgeführt. Für die Novirhaboviren VHSV und IHNV konnten diese Untersuchungen nicht durchgeführt werden. Die Validierung der molekularbiologischen Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis der Fischviren sollte in Kooperation und in Abstimmung mit einem Parallelprojekt in Bayern geschehen. Dieses konzentrierte sich von Beginn an auf die Etablierung und Validierung molekularer Methoden. Dabei wurde als Kernproblem erkannt, dass die zu untersuchenden Fischviren in den komplexen Matrices der Umwelt (Schlamm, Sedimente etc.) und im Wasser der Teichanlagen nicht ausreichend sensitiv nachweisbar sind. Aus diesem Grund konzentrierten sich unsere Arbeiten auf klassische zellkulturbasierte Techniken zum Nachweis und zur Quantifizierung der Testviren. Dadurch war eine vergleichende Auswertung zwischen den Ergebnissen der klassischen Laboruntersuchungen zur Desinfektionsmittelprüfung, der Tenazitätsversuche, der Laborteichuntersuchungen und der Felduntersuchungen möglich. Molekularbiologische Untersuchungen hätten nicht für alle Untersuchungsbereiche valide Befunde erbracht (Laborteiche, Feldversuche).

Eine Optimierung und Validierung der molekularbiologischen Techniken sollte aber in Zukunft auf alle Fälle durchgeführt werden. Dies ist unter Berücksichtigung der zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausreichenden Sensitivität der diagnostischen Methoden zum Zeitpunkt des Ausbruchs dringend nötig; i.e. zum Zeitpunkt des Ausbruchs können die verursachenden Viren nur in den betroffenen Fischen, nicht aber oder nur sehr eingeschränkt in ihrem Habitat nachgewiesen werden.

Die Teilaufgabe 6) Durchführung der Desinfektionsmittelprüfungen mit den Testviren, wurden für das KHV und VHSV vollständig durchgeführt und mit Teilergebnissen für das Surrogatvirus HVAV 110 ergänzt. Die Ergebnisse der DM-Prüfung für das VHSV sollten durch sog. Eckwertprüfungen für das IHNV noch ergänzt werden.

Die Teilaufgabe 7) Trocknung der Viren wurde für das KHV, das HVAV und das VHSV vollständig durchgeführt. Auch hier stehen die Untersuchungen zur Vergleichbarkeit der generierten Ergebnisse zwischen VHSV und IHNV noch aus.

Die Teilaufgabe 8) Messung der Wirkung verschiedener Brannt- und Löschkalkbehandlungen auf Fischviren unter unterschiedlichen Bedingungen war ursprünglich nur bei einem pH-Wert von 12 geplant und wurde um die Untersuchungen bei pH 11 erweitert. Für 2 Sedimentarten aus unterschiedlichen Naturteichen wurden diese Untersuchungen für das KHV und VHSV bei pH 11 und 12 vollständig durchgeführt. Außerdem wurden diese Untersuchungen für das VHSV durch die Verwendung eines künstlichen Sediments bei pH 12 (eingestellt mittels Branntkalk) ergänzt. Das HVAV wurde nur mit einer Sedimentart aus einem Naturteich bei pH 12 untersucht.

Für die Teilaufgabe 9) Feldversuche waren ursprünglich insgesamt ca. 10 Feldversuche geplant. Leider kam es während der Laufzeit des Forschungsprojektes nur zu wenigen Ausbrüchen viraler Fischseuchen in Deutschland. Zusätzlich hatte sich gezeigt, dass sich die Organisation der geplanten Freilandversuche z. T. schwierig gestaltete, da die Koordination der geplanten und standardisierten Feldversuche mit den laufenden Desinfektionsmaßnahmen, die im Falle eines Tierseuchenausbruchs amtlich durchgeführt werden müssen, zeitlich und organisatorisch schwierig waren. Trotzdem konnten drei Feldversuche im geplanten Umfang erfolgreich durchgeführt werden. Leider handelte sich dabei in allen Fällen um den Ausbruch der viralen hämorrhagischen Septikämie der Salmoniden und es konnten deshalb nur für das

diese Krankheit verursachende VHS-Virus Freilanddaten generiert werden. Dennoch sind diese Ergebnisse äußerst wertvoll für die Ableitung von Empfehlungen für die Durchführung der Desinfektionsmaßnahme und die Kontrolle des Desinfektionserfolges in der Praxis.

Die Teilaufgabe 10) Untersuchung der Ökotoxikologie wurde komplett durchgeführt. Aus organisatorischen Gründen war es nicht möglich die ökologischen Monitorings den Feldversuchen anzuschließen. In Absprache mit den Kooperationspartnern wurden jedoch insgesamt 5 ökologische Monitorings begleitend zu einer routinemäßigen Desinfektionsmaßnahme in verschiedenen Forellenzuchtanlagen durchgeführt. Trotz intensiver Bemühungen seitens der Auftragnehmer sowie der projektbegleitenden Behörden konnten leider keine weiteren Betriebe für eine Zusammenarbeit gewonnen werden.

Alle Makrozoobenthosproben aus 2012 wurden komplett ausgezählt und die Organismen mit Hilfe der aktuellen Literatur möglichst genau bestimmt. Trotz der oft hohen Abundanz einzelner Taxa wurde darauf verzichtet standardmäßig Teilproben auszuzählen, um so die Abundanzverhältnisse vor Ort möglichst genau abzubilden. Dieser durchaus nennenswerte Mehraufwand wurde möglich, da zum Zeitpunkt der Bestimmungsarbeiten bereits absehbar war, dass weniger als die angebotenen 10 Monitorings durchgeführt würden.

Detaillierte Angaben über weiterhin bestehende Forschungslücken

Aus der Analyse der Ergebnisse des vorliegenden Forschungsprojekts ergeben sich aus Sicht der Projektnehmer folgende Forschungslücken, die in nachfolgenden Projekten bearbeitet werden sollten:

- vergleichende Feldversuche mit Branntkalk und Löschkalk zur Effizienz und Dauer von Inaktivierungsprozessen bei VHS-Ausbrüchen
- Feldversuche zur Effizienz und Dauer von Inaktivierungsprozessen bei Ausbrüchen mit anderen Fischseuchen-Viren (i.e. KHV, IHN), für Brannt- und Löschkalk, vergleichend.
- Weiterführende Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Teichsedimente (Teichschlamm) auf die Effizienz und Dauer von Inaktivierungsprozessen bei den verschiedenen Fischviren.
- Weiterführende Versuche zu synergistischen Effekten von Desinfektionsmaßnahmen (Trocknung, Wärme, Desinfektionsmittel)

- Einbeziehung anderer potentieller Desinfektionsmittel als Ergänzung zu Brannt- und Löschkalk bei der Desinfektion von Teichanlagen (auch Handelspräparate)
- Eckwert-Bestimmungen von Desinfektionsmittel-Wirkungen für das IHN-Virus: trotz der engen verwandtschaftlichen Beziehung und vergleichbaren biologischen Charakteristika von VHSV und IHNV (beide sind Vertreter des Genus Novirhabdovirus). Es ist zwar mit hoher Sicherheit davon auszugehen, dass sich VHSV und IHNV in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Desinfektionsmittel und den davon abgeleiteten Desinfektionsverfahren sehr stark ähneln, dennoch sollte das mit Eckwertbestimmungen sicher abgeklärt werden
- Entwicklung und Validierung von molekularbiologischen Methoden (qualitativ und quantitativ) für den Nachweis der relevanten Fischviren in verschiedenen Matrices der Teich- und Aquakulturanlagen (Wasser, Teichschlamm, Erde). Die komplexen Matrices der Umwelt (Schlamm, Sedimente etc.) und im Wasser der Teichanlagen müssen insbesondere hinsichtlich der Sensitivität der zu etablierenden Testsysteme ausreichend berücksichtigt werden. Da mit den molekularen Methoden auch der Desinfektionserfolg überprüfbar gemacht werden soll, ist auch der Einfluss der Vorbehandlung der Untersuchungsmatrices mit Desinfektionsmitteln zu berücksichtigen.

6 Literaturverzeichnis

- Brown, J. D., G. Goekjian, et al. (2009). Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. *Veterinary Microbiology* 136: 20-26.
- Brown, J. D., D. E. Swayne, et al. (2007). Persistence of H5 and H7 Avian Influenza Viruses in Water. *Avian Diseases* 51: 285-289.
- CEN (2011). EN 14476, Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika-Quantitativer Suspensionsversuch Viruzidie für in der Humanmedizin verwendete chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Prüfverfahren und Anforderungen, Europäische Komitee für Normung.
- DVG (2007). Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel in der Veterinärmedizin.
- Frerichs, G. N., A. Tweedie, et al. (2000). Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture* 185: 13-24.
- Hanert, F. M. (2011). Desinfektion des viralen hämorrhagischen Septikämievirus (VHS) durch Formalin bei verschiedenen Temperaturen (4°C, 10°C, 20°C). Institute of Environmental and Animal Health (460b). Stuttgart, University of Hohenheim. Diploma Thesis.
- Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 162: 480-483.
- MEIER C. ET AL. (2006): Methodisches Handbuch Fließgewässerbewertung. <http://www.fliessgewaesserbewertung.de>
- Nazir, J., R. Haumacher, et al. (2010). Use of filter carrier technique to measure the persistence of avian influenza viruses in wet environmental conditions. *Journal of Virological Methods* 170: 99-105.
- OECD/OCDE (2004). OECD Guidelines for the testing of chemicals-Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment. 218.
- OIE (2009). Chapter 1.1.2 Methods for Disinfection of aquaculture establishments. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals* 2009.
- Reed, L. J. and H. Muench (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27(3): 493 - 497.
- Spearman, C. (1908). The method of „right and wrong cases („constant stimuli“) without Gauss's formulae. *Brit. J. Psychol.* 2: 227-242.
- Strang, E. J. P. (2011). Entwicklung von Keimträgern für den Einsatz mit Fischherpesviren (KHV und HVAV) sowie praxisnahe Versuche zu deren Desinfektion mit Kalk. Institute of Environmental and Animal Health (460b). Stuttgart, University of Hohenheim. Diploma Thesis.
- Traub, F., S. K. Spillmann, et al. (1986). Method for Determining Virus Inactivation during Sludge Treatment Processes. *Applied and Environmental Microbiology* 52(3): 498-503.

7 Anhänge

Anhang I

Tabelle A1: Ergebnisse pH-Sensitivität – HVAV 110 – Suspensionsversuche – pH-Einstellung mit 1 M NaOH bzw. HCl (n. n. = nicht nachweisbar bei einer Nachweisgrenze von $\leq 1,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$)

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$											
	Virus			A. dest.			pH 3			pH 5		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Titer (1:100)	7,50	6,75	6,50	5,25	4,75	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,50
(t_0)	7,50	6,75	6,50	4,83	4,92	4,50	4,33	4,00	3,67	4,83	5,33	4,83
15 min	7,00	6,63	6,25	5,00	5,08	4,83	3,00	n. n.	1,58	4,83	4,83	4,08
30 min	7,00	7,00	6,63	5,08	5,25	4,33	2,17	n. n.	n. n.	4,42	4,83	4,42
1 h	6,75	6,88	6,88	5,08	4,92	4,58	n. n.	n. n.	n. n.	4,42	4,75	3,25
2 h	6,64	7,00	6,63	5,00	5,08	4,50	n. n.	n. n.	n. n.	4,33	4,67	4,08
4 h	6,75	7,00	6,38	4,92	4,67	4,00	n. n.	n. n.	n. n.	3,83	4,17	3,42
pH				7,65	7,65	7,65	3,25	3,13	3,33	5,02	4,93	5,38
				7,52	7,6	7,6	3,23	3,09	3,24	4,89	4,77	5,02
°C				11,7	15,1	21,8	10,5	17,47	23,8	11,77	15,73	22,27
				6	11,33	20,57	5,87	11,57	21,1	6,57	11,67	20,93
Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$											
	pH 7			pH 10			pH 11			pH 12		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Virustiter	5	5,00	4,75	5,50	5,5	5,25	5,25	5,5	5,25	4,50	5,5	5,00
(t_0)	4,83	5,08	4,75	4,17	4,33	4,33	4,58	4,58	4,25	4,33	1,17	2,67
15 min	5,00	5,08	4,58	4,50	4,50	4,25	4,33	3,92	4,17	2,83	n. n.	1,42
30 min	4,83	4,92	4,58	4,00	4,50	3,50	4,42	3,58	3,58	2,17	n. n.	n. n.
1 h	5,00	5,33	4,50	4,08	4,83	3,75	4,42	3,00	3,25	n. n.	n. n.	n. n.
2 h	4,92	5,00	4,17	4,00	4,50	4,00	4,08	2,42	3,33	n. n.	n. n.	n. n.
4 h	4,50	4,67	3,83	4,25	4,25	3,92	3,92	2,33	2,92	n. n.	n. n.	n. n.
pH	7,14	6,98	7,19	9,95	9,87	9,94	10,89	11,17	10,91	12,28	12,21	12,03
	7,07	6,94	7,09	9,61	9,48	9,47	10,35	10,69	10,37	12,13	12,12	11,85
°C	11,4	16,1	22,83	14,47	16,7	22,47	11,17	17,77	21,83	11,83	16,47	21,83
	5,7	11,3	20,83	5,73	11,3	20,67	6,33	11,37	20,67	6,17	11,42	20,67

Tabelle A2: Ergebnisse pH-Sensitivität – HVAV 110 – Suspensionsversuche – pH-Einstellung mit Ca(OH)₂ (n. n. = nicht nachweisbar bei einer Nachweisgrenze von $\leq 1,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$)

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$								
	pH 10			pH 11			pH 12		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Titer (1:100)	4,75		4,75	4,5		5,50	4,75		5,25
(t₀)	5,25		4,83	4,58		2,00	n. n.		1,17
15 min	5,08		4,83	3,83		n. n.	n. n.		n. n.
30 min	5,33		4,83	3,69		n. n.	n. n.		n. n.
1 h	5,00		4,75	2,50		n. n.	n. n.		n. n.
2 h	4,92		5,00	2,17		n. n.	n. n.		n. n.
4 h	4,92		4,58	1,67		n. n.	n. n.		n. n.
pH	10,12		10,05	11,07		11,23	12,08		11,85
	9,62		9,87	10,57		11,15	11,99		11,61
°C	12,93		21,67	7,87		21,83	14,87		21,43
	7,27		20,9	6,87		21,03	7,03		21,00

Tabelle A3: Ergebnisse pH-Sensitivität – HVAV 110 – Sandwichkeimträgerversuche – pH-Einstellung mit 1 M NaOH (n. n. = nicht nachweisbar bei einer Nachweisgrenze von $\leq 0,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$)

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$								
	pH 10			pH 11			pH 12		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Titer (1:100)	7,00		7,25	6,75		6,75	6,75		6,75
Kontrolle	5,88		5,83	5,88		5,92	5,88		5,67
15 min	6,00		5,92	5,58		6,00	5,75		5,67
4 h	5,58		5,33	5,67		5,42	5,92		5,08
24 h	5,33		4,17	5,17		1,00	4,25		n.n.
pH	9,84		9,89	10,78		11,14	11,81		12,11
	9,47		9,59	9,87		10,91	10,77		11,96
°C	15,5		21,58	14,07		21,25	12,4		21,3
	7,1		20,9	7,9		21,07	8,03		20,94

Tabelle A4: Ergebnisse pH-Sensitivität – HVAV 110 – Sandwichkeimträgerversuche – pH-Einstellung mit Ca(OH)₂ (n. n. = nicht nachweisbar bei einer Nachweisgrenze von $\leq 0,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$)

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$								
	pH 10			pH 11			pH 12		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Virustiter	7,25		7,00	7,25		7,00	7,25		7,00
Kontrolle	6,00		6,00	6,00		6,00	6,00		6,00
15 min	6,08		5,75	5,83		6,17	5,75		6,08
4 h	5,67		5,25	5,92		5,75	5,75		5,75
24 h	5,92		5,08	5,67		5,25	5,50		2,33
pH	10,11		10,18	11,16		11,04	11,98		12,02
	9,68		9,79	10,76		10,61	12,02		11,92
°C	10,67		22,5	11,8		22,03	13,2		21,4
	8,27		20,6	8,4		20,7	8,47		20,6

Tabelle A5: Ergebnisse pH-Sensitivität – KHV-T – Suspensionsversuche – pH-Einstellung mit 1 M NaOH bzw. HCl (n. n. = nicht nachweisbar bei einer Nachweisgrenze von $\leq 1,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$)

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$											
	Virus			A. dest.			pH 3			pH 5		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Titer (1:100)	6,75	6,75	6,75	4	3,75	3,75	4,50	4,75	4,75	7		4,75
(t_0)	6,75	6,75	6,75	4,42	3,83	3,83	0,42	n. n.	n. n.	5,17		4,33
15 min	6,63	6,88	7,00	4,42	3,75	3,92	n. n.	n. n.	n. n.	4,67		4,25
30 min	6,88	6,88	6,88	4,58	3,67	3,58	n. n.	n. n.	n. n.	4,75		4,42
1 h	7,00	6,88	7,00	4,67	4,00	3,83	n. n.	n. n.	n. n.	4,50		3,83
2 h	6,85	7,00	6,75	4,33	3,75	3,42	n. n.	n. n.	n. n.	4,25		3,58
4 h	6,88	6,88	6,88	4,50	3,67	3,50	n. n.	n. n.	n. n.	4,17		3,50
pH				6,8	7,71	7,64	3,15	3,01	3,08	4,88		5,20
				6,75	7,65	7,6	3,07	2,96	3,02	4,83		5,01
°C				10,7	15,07	20,87	11,93	15,47	22,1	12,83		22,93
				7,1	12,6	20,37	7,3	12,27	21,0	7,8		20,9
Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$											
	pH 7			pH 10			pH 11			pH 12		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Titer (1:100)	5,5	4,00	4,00	4,00	4,5	5,50	4,00	4,5	5,5	4,75	5	5,00
(t_0)	5,58	4,67	4,67	4,75	4,58	4,67	4,50	4,50	3,88	n. n.	n. n.	n. n.
15 min	5,25	4,67	4,67	4,50	4,58	4,50	4,25	4,25	4,25	n. n.	n. n.	n. n.
30 min	5,67	4,33	5,25	4,67	4,67	4,33	4,33	4,00	4,08	n. n.	n. n.	n. n.
1 h	5,25	4,50	4,83	4,50	4,67	4,17	4,08	3,83	3,83	n. n.	n. n.	n. n.
2 h	5,58	4,83	5,08	4,17	4,83	4,25	3,75	3,83	3,00	n. n.	n. n.	n. n.
4 h	5,33	4,92	4,83	4,08	4,17	4,08	3,58	3,83	2,67	n. n.	n. n.	n. n.
pH	7,06	7,12	6,98	10,24	10,23	10,1	11,09	11,01	11,05	12,13	12,26	12,14
	6,92	7,05	6,97	9,83	9,94	9,76	10,7	10,61	10,6	12,01	12,17	12,06
°C	14,27	15,3	21,5	14,9	15,8	21,5	13,8	15,96	21,7	12,3	17,07	21,97
	6,83	12,13	20,9	7,03	13	20,7	7,7	11,7	20,7	7,03	12,87	20,73

Tabelle A6: Ergebnisse pH-Sensitivität – KHV-T – Suspensionsversuche – pH-Einstellung mit Ca(OH)₂ (n. n. = nicht nachweisbar bei einer Nachweisgrenze von $\leq 1,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$)

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$								
	pH 10			pH 11			pH 12		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Titer (1:100)	5,50	5,50	4,25		5,50	5,00	5,50	4,75	4,25
(t ₀)	5,00	4,83	4,58		3,42	0,67	1,75	1,58	n. n.
15 min	5,17	5,00	4,67		1,83	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
30 min	5,00	4,67	4,67		n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
1 h	4,92	4,83	4,58		n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
2 h	5,25	4,42	4,33		n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
4 h	4,92	4,67	4,08		n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
pH	10,31	10,40	10,10		11,00	11,18	11,88	11,89	12,05
	10,11	9,97	9,88		9,77	11,03	11,51	11,29	11,91
°C	14,37	13,33	22,03		13,6	22,77	10,87	13,1	22,9
	7,6	12,07	20,9		12,4	20,87	7,17	11,8	20,97

Tabelle A7: Ergebnisse pH-Sensitivität – KHV-T – Sandwichkeimträgerversuche – pH-Einstellung mit 1 M NaOH (n. n. = nicht nachweisbar bei einer Nachweisgrenze von $\leq 0,5$ bzw. $1,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$)

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$								
	pH 10			pH 11			pH 12		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Virustiter	6,50	6,75	7,50	6,50	6,75	7,50	6,50	6,75	7,50
Kontrolle	3,83	5,17	5,17	3,83	5,17	5,17	3,83	5,17	5,17
15 min	4,08	5,33	4,67	4,25	5,08	4,67	4,08	4,83	5,25
4 h	4,08	5,00	5,08	4,33	5,08	4,67	4,00	4,67	n. n.
24 h	4,33	3,50	2,58	3,00	2,5	n. n.	1,00	n. n.	n. n.
pH	9,92	10,29	9,95	11,12	11,09	11,15	11,9	11,93	12,01
	9,43	9,82	9,51	10,44	10,49	11,02	11,70	11,86	11,98
°C	13,23	12,63	24	14,37	12,53	22,9	12,33	13,3	24
	8,6	11,2	21,9	8,77	9,83	22,1	8,06	11,53	21,43

Tabelle A8: Ergebnisse pH-Sensitivität – KHV-T – Sandwichkeimträgerversuche – pH-Einstellung mit Ca(OH)₂ (n. n. = nicht nachweisbar bei einer Nachweisgrenze von $\leq 0,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$)

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$								
	pH 10			pH 11			pH 12		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Virustiter	6,50	6,75	7,50	6,50	6,75	7,50	6,50		7,50
Kontrolle	3,83	5,17	5,17	3,83	5,17	5,17	3,83	5,17	5,17
15 min	4,67	4,67	4,92	4,17	4,67	5,17	4,25	4,92	5,17
4 h	4,25	5,17	4,83	4,58	5,25	4,92	4,50	5,00	5,08
24 h	4,58	5,25	4,33	4,25	5,17	2,33	3,58	2,83	n. n.
pH	10,29	10,09	10,27	11,08	11,20	11,25	11,90	11,90	12,04
	9,56	9,61	9,98	10,76	10,97	11,16	11,83	11,85	11,95
°C	15	13,3	23,3	13,03	12,47	22,2	13,93	13,64	24,57
	9,13	12,45	21,3	8,36	9,87	21,9	9	11,97	21,2

Tabelle A9: Ergebnisse pH-Sensitivität – VHSV 1087 – Suspensionsversuche – pH-Einstellung mit 1 M NaOH bzw. HCl (n. n. = nicht nachweisbar bei einer Nachweisgrenze von $\leq 1,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$)

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$											
	Virus			A. dest.			pH 3			pH 5		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Titer (1:100)				5,75	5,25	5,00	5,75	5,25	4,88	5,00	5,25	4,50
(t_0)	7,25	7,25	6,88	5,50	5,08	5,33	4,92	4,75	4,67	5,33	5,17	5,42
15 min	7,50	7,25	7,13	5,50	3,75	4,58	4,67	4,25	2,83	5,33	4,33	4,67
30 min	7,25	6,88		5,42	3,23	4,08	4,58	4,25	2,00	5,75	3,83	4,50
1 h	7,25	7,00	7,13	5,25	2,50	3,58	4,08	3,75	1,58	6,00	3,50	4,33
2 h	7,50	6,88	7,13	5,67	2,25	2,92	3,92	3,42	n. n.	5,42	2,83	4,50
4 h	7,38	7,00	7,38	5,58	1,75	2,67	1,50	3,17	n. n.	5,33	2,75	3,83
pH				7,79	7,68	7,57	3,08	3,18	3,06	5,21	5,38	5,09
				7,67	7,65	7,47	3,04	3,05	2,98	4,90	4,88	4,90
°C				10,70	15,50	21,13	11,20	17,10		12,50	17,67	
				6,25	11,70	20,60	5,67	11,60		6,60	11,37	

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$											
	pH 7			pH 10			pH 11			pH 12		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Titer (1:100)	5,50	5,50	4,75	6,00	5,75	4,75	5,50	5,75	5,5	5,75	5,75	5,5
(t_0)	5,75	5,42	5,00	5,50	5,58	4,58	5,42	5,58	4,83	5,33	5,50	4,67
15 min	5,75	5,17	5,08	5,33	5,67	4,83	5,33	5,42	5,08	5,08	5,17	4,50
30 min	5,92	5,83	5,25	5,42	5,75	4,92	5,42	5,50	4,75	4,92	5,25	4,25
1 h	5,92	5,58	5,25	5,33	5,50	4,50	5,17	5,25	4,67	5,42	5,25	4,33
2 h	6,00	5,58	5,00	5,42	5,50	4,58	5,33	5,17	4,58	5,33	4,92	3,92
4 h	5,75	5,67	5,25	5,33	5,42	4,58	5,33	5,25	4,42	4,83	4,83	3,67
pH	7,11	6,97	7,00	9,89	10,13	10,08	10,83	11,05	11,08	12,06	12,01	11,88
	6,99	6,99	7,23	9,78	10,04	9,75	10,52	10,72	10,75	11,93	11,93	11,61
°C	12,07	11,40	23,63	12,33	16,30	23,33	12,53	15,40	22,07	11,57	14,23	22,47
	6,63	13,13	20,97	5,03	12,13	21,03	5,43	11,53	20,90	6,63	13,03	21,03

Tabelle A10: Ergebnisse pH-Sensitivität – VHSV 1087 – Suspensionsversuche – pH-Einstellung mit Ca(OH)₂ (n. n. = nicht nachweisbar bei einer Nachweisgrenze von $\leq 1,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$)

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$								
	pH 10			pH 11			pH 12		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Titer (1:100)	5,50	5,50	6,00	5,50	5,25	6,00	5	5,50	5
(t₀)	6,25	5,25	5,75	5,42	5,67	5,50	5,17	5,33	5,08
15 min	5,67	5,58	5,67	5,42	5,42	5,92	4,83	4,92	4,17
30 min	5,75	6,00	5,75	5,42	5,42	5,25	4,92	4,58	3,67
1 h	5,67	1,50	5,67	5,42	5,25	5,83	4,67	4,58	2,75
2 h	5,75	5,58	5,58	5,25	5,17	5,50	4,83	3,75	n. n.
4 h	5,67	5,83	5,92	5,33	5,08	5,33	4,75	3,08	n. n.
pH	10,02	9,85	10,11	11,15	11,20	11,12	12,09	11,94	12,07
	9,48	9,32	9,95	10,65	10,73	10,66	12,05	11,88	11,97
°C	12,17	12,73	21,47	11,67	15,37	22,93	9,37	15,17	21,73
	7,33	11,97	20,93	7,33	12,03	21,13	7,26	11,97	20,73

Tabelle A11: Ergebnisse pH-Sensitivität – VHSV 1087 – Sandwichkeimträgerversuche – pH-Einstellung mit 1 M NaOH (n. n. = nicht nachweisbar bei einer Nachweisgrenze von $\leq 0,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$)

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$								
	pH 10			pH 11			pH 12		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Virustiter	6,25	6,25	7,25	6,00	7,50	7,25	6,25	6,25	7,25
Kontrolle	3,92	3,92	5,00	4,17	5,25	5,00	3,92	3,92	5,00
15 min	4,67	4,08	4,50	3,67	5,00	5,50	4,50	4,08	5,08
4 h	4,33	4,25	4,83	4,08	4,92	5,08	3,92	4,00	3,92
24 h	4,08	4,33	2,83	3,75	4,83	1,08	3,50	2,42	n. n.
pH	10,31	10,27	10,15	10,92	10,98	11,09	12,01	11,84	12,10
	9,92	10,03	9,90	10,62	10,25	10,91	11,91	11,84	11,90
°C	10,90	12,83	22,17	11,37	15,03	22,03	11,63	13,97	22,07
	6,83	12,30	21,07	6,8	12,43	21,00	7,4	11,87	20,90

Tabelle A12: Ergebnisse pH-Sensitivität – VHSV 1087 – Sandwichkeimträgerversuche – pH-Einstellung mit Ca(OH)₂ (n.n. = nicht nachweisbar bei einer Nachweisgrenze von $\leq 0,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$)

Zeit [min]	Mittelwerte $\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$								
	pH 10			pH 11			pH 12		
	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C	4°C	10°C	20°C
Virustiter	7,00	6,00	7,25	7,00	6,00	7,25	7,00	6,00	7,25
Kontrolle	5,92	4,17	5,00	5,92	4,17	5,00	5,92	4,17	5,00
15 min	5,92	4,08	4,92	5,58	4,00	4,50	5,50	4,42	3,75
4 h	5,83	4,25	5,00	5,67	4,42	4,83	5,67	4,42	1,58
24 h	5,58	3,50	4,25	4,58	4,17	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
pH	10,41	10,04	10,22	11,21	11,12	11,12	12,04	11,92	11,93
	9,81	9,6	9,46	10,93	10,36	10,62	11,90	11,82	11,82
°C	12,03	13,9	21,70	12,50	13,2	22,30	15,93	15,27	22,80
	7,60	12,73	20,80	7,67	11,77	20,83	7,70	11,93	20,80

Tabelle A13: Daten – Tenazität von HVAV 110 / KHV-T in Aquakultur – Oberflächenwasser bei 4°C, 10°C, 20°C, Mittelwerte (MW) der Virustiter $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ und Standardabweichung (Stabw), zur Berechnung der linearen Regression wurde die Nachweisgrenze von $\leq 0,5 - 1,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ gleich Null gesetzt

Aquakultur- Oberflächenwasser	4°C				10°C				20°C			
	HVAV		KHV		HVAV		KHV		HVAV		KHV	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
Kontrolle	5,67	0,29	4,67	0,29	5,42	0,58	5,42	0,14	6,13	0,18	5,42	0,14
Tag 1	5,33	0,38	3,75	0,43	5,00	0,50	4,25	0,25	4,92	0,38	4,08	0,29
Tag 14	4,33	0,38	2,42	0,14	3,17	1,04	1,33	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
Tag 28	2,58	0,38	1,17	1,01	1,58	1,38	0,58	1,01	0,33	0,58	n. a.	n. a.
Tag 42	1,25	0,00	0,00	0,00	1,00	1,73	0,58	1,01	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
Regression	$y = -0,1038x + 5,5987$		$y = -0,1029x + 4,149$		$y = -0,1071x + 5,0532$		$y = -0,1101x + 4,3044$		$y = -0,2083x + 5,0825$		$y = -0,3559x + 4,946$	
Bestimmtheitsmaß R^2	R2 = 0,9945		R2 = 0,9662		R2 = 0,9548		R2 = 0,7775		R2 = 0,7639		R2 = 0,9699	
D-90 ($10^1\text{KID}_{50}/\text{ml}$) in Tagen	9,63		9,72		9,34		9,08		4,80		2,81	
D-90 ($10^6\text{KID}_{50}/\text{ml}$) in Tagen	57,80		58,31		56,02		54,50		28,80		16,86	

Tabelle A14: Daten – Tenazität von HVAV 110 / KHV-T in Hohenheimer Eiszeitteich – Oberflächenwasser bei 4°C, 10°C, 20°C , Mittelwerte (MW) der Virustiter $\log_{10}KID_{50}/ml$ und Standardabweichung (Stabw), zur Berechnung der linearen Regression wurde die Nachweisgrenze von $\leq 0,5 - 1,5 \log_{10}KID_{50}/ml$ gleich Null gesetzt

Eiszeitteich- Oberflächenwasser	4°C				10°C				20°C			
	HVAV		KHV		HVAV		KHV		HVAV		KHV	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
Kontrolle	5,67	0,29	4,67	0,29	5,42	0,58	5,42	0,14	6,13	0,18	5,42	0,14
Tag 1	5,75	0,43	3,83	0,38	5,33	0,14	4,58	0,14	4,50	0,00	4,42	0,38
Tag 14	3,67	0,38	1,58	0,14	1,58	1,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tag 28	0,25	0,25	0,67	1,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n. a.	n. a.
Tag 42	0,08	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	n. a.	n. a.
Regression	$y = -0,1496x + 5,6268$		$y = -0,1062x + 3,9557$		$y = -0,2026x + 5,261$		$y = -0,3723x + 5,1947$		$y = -0,3986x + 5,5345$		$y = -0,3668x + 5,1118$	
Bestimmtheitsmaß R²	R2 = 0,9341		R2 = 0,8992		R2 = 0,9561		R2 = 0,9937		R2 = 0,9625		R2 = 0,9879	
D-90 (10¹KID₅₀/ml) in Tagen	6,68		9,42		4,94		2,69		2,51		2,73	
D-90 (10⁶KID₅₀/ml) in Tagen	40,11		56,50		29,62		16,12		15,05		16,36	

Tabelle A15: Daten – Tenazität von HVAV 110 in Aquakultur – Teichschlamm bei 10°C und 20°C , Mittelwerte (MW) der Virustiter $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ und Standardabweichung (Stabw), zur Berechnung der linearen Regression wurde die Nachweisgrenze von $\leq 0,5 - 1,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ gleich Null gesetzt

Aquakultur- Teichschlamm	10°C		20°C	
	HVAV		HVAV	
	MW	Stabw	MW	Stabw
Kontrolle	5,42	0,58	4,42	0,95
Tag 1	5,42	0,14	5,00	0,50
Tag 14	3,00	0,66	1,83	0,58
Tag 28	1,50	1,30	0,00	0,00
Tag 42	0,33	0,58	0,00	0,00
Regression	$y = -0,174x + 4,6832$		$y = -0,1253x + 5,2638$	
Bestimmtheitsmaß R^2	R2 = 0,968		R2 = 0,9744	
D-90 ($10^1\text{KID}_{50}/\text{ml}$) in Tagen	5,75		7,98	
D-90 ($10^6\text{KID}_{50}/\text{ml}$) in Tagen	34,48		47,89	

Tabelle A16: Ergebnisse der Desinfektionsmittelprüfung – Suspensions- und Keimträgerversuche, Virustiter der "Resttitration" mit Standardabweichung (Stabw) von HVAV 110 (* = Parallelversuch fehlt, NWG = Nachweisgrenze log₁₀KID₅₀/ml)

HVA 110 / Suspensionsversuche					VT der "Restvirustitration" [log ₁₀ KID ₅₀ /ml]				Stabw Titer			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontr	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Ameisensäure	0,10	4°C	7,73	0,18	7,48	7,48	7,23	7,35	0,18	0,18	0,18	0,35
		10°C	7,73	0,18	6,85	6,48	6,73	5,60	0,35	0,18	0,18	1,77
		20°C	7,73	0,18	7,33	7,23	7,48	7,35	0,04	0,18	0,88	0,00
Ameisensäure NWG ≤ 2,5 bzw. ≤ 3,1	0,25	4°C	7,43	0,11	2,80	2,80	2,80	2,80	0,42	0,42	0,42	0,42
		10°C	7,85	0,00	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	7,48	0,18	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Ameisensäure NWG ≤ 3,1	0,50	4°C	7,60	0,00	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	7,23	0,53	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	7,73	0,18	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Ameisensäure NWG ≤ 3,1	1	4°C	7,60	0,00	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	6,60	0,35	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	7,73	0,18	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Formalin	1	4°C	7,48	1,24	6,48	5,35	4,23	4,10	0,88	0,35	0,18	0,00
		10°C	7,60	0,71	5,85	5,48	4,73	4,10	0,71	0,88	0,88	0,00
		20°C	7,35	1,06	5,73	4,35	4,10	4,23	1,59	0,00	0,00	0,18
Formalin NWG ≤ 4,1	3	4°C	8,10	0,71	5,98	4,10	4,10	4,10	0,53	0,00	0,00	0,00
		10°C	7,98	0,53	4,48	4,23	4,10	4,10	0,53	0,18	0,00	0,00
		20°C	7,98	0,18	4,10	4,10	4,10	4,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG ≤ 3,1 bzw. 4,1	0,025	4°C	7,60	0,35	6,10	5,85	5,35	4,35	0,35	0,00	0,71	0,35
		10°C *	7,85		5,10	5,10	4,85	4,35				
		20°C	7,60	0,00	3,73	3,60	3,70	3,60	0,18	0,71	0,57	0,71
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG ≤ 3,1 - ≤ 4,1	0,05	4°C	7,60	0,35	4,10	3,85	3,98	4,10	0,00	0,35	0,18	0,00
		10°C *	7,85		3,60	3,35	4,10	3,31				
		20°C	7,60	0,00	3,60	3,60	3,60	3,60	0,71	0,71	0,71	0,71

HVAV 110 / Suspensionsversuche					VT der "Restvirustitration" [\log_{10} KID ₅₀ /ml]				Stabw Titer			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontr	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG \leq 4,1	0,10	4°C	7,48	0,18	4,10	4,10	4,10	4,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	7,73	0,18	4,10	4,10	4,10	4,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	7,60	0,00	4,10	4,10	4,10	4,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex	0,25	4°C	7,60	0,00	4,73	4,85	5,23	4,73	0,18	0,35	0,18	0,53
		10°C										
		20°C *	8,60		5,60	4,60	5,10	4,60				
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex	0,50	4°C	7,35	0,35	4,23	3,98	4,10	4,35	0,18	0,53	0,35	0,35
		10°C										
		20°C *	8,60		5,10	4,10	3,85	3,60				
Kalkmilch NWG \leq 3,1	pH 12	4°C	7,60	0,35	3,35	3,48	3,23	3,10	0,35	0,53	0,18	0,00
		10°C	7,48	0,53	3,35	3,10	3,23	3,10	0,35	0,00	0,18	0,00
		20°C	8,10	0,35	3,35	3,10	3,10	3,10	0,35	0,00	0,00	0,00
Peressigsäure	0,01	4°C	7,60	0,35	7,23	6,73	6,60	6,48	0,53	0,18	0,35	0,53
		10°C	7,85	0,00	6,98	6,85	7,10	6,35	0,88	0,35	0,71	0,35
		20°C	8,10	0,35	6,98	6,73	6,85	6,85	0,18	0,18	0,35	0,00
Peressigsäure NWG \leq 3,1	0,025	4°C	7,60	0,00	5,85	6,35	6,10	5,85	0,35	0,35	0,00	0,71
		10°C	7,35	0,35	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	7,98	0,18	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Peressigsäure NWG \leq 3,1	0,05	4°C	7,48	0,18	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	7,35	0,35	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	7,98	0,18	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Peressigsäure NWG \leq 3,1	0,1	4°C	7,48	0,18	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	7,35	0,35	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	7,98	0,18	3,60	3,60	3,10	3,10	0,71	0,71	0,00	0,00

HVAV 110 / Keimträgerversuche					VT der "Restvirustitration" [\log_{10} KID ₅₀ /ml]				Stabw Titer			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontr	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Ameisensäure NWG \leq 1,5	0,10	4°C	6,25	0,35	3,63	1,00	1,00	1,00	3,07	0,58	0,58	0,58
		10°C										
		20°C										
Formalin NWG \leq 1,5	1	4°C										
		10°C										
		20°C	6,63	0,32	5,38	4,69	2,13	2,00	0,14	1,14	0,72	0,58
Formalin NWG \leq 1,5 - 2.5		4°C										
		10°C										
		20°C	6,75	0,46	3,63	2,19	2,00	2,19	1,93	0,47	0,58	0,38
Peressigsäure NWG \leq 1,5	0,010	4°C										
		10°C										
		20°C										
Peressigsäure NWG \leq 1,0 - 1,5	0,025	4°C	6,00	0,35	1,50	1,50	1,50	1,50	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C										
		20°C	6,69	0,47	2,19	1,50	1,00	1,00	0,94	0,82	0,58	0,58

Tabelle A17: Ergebnisse der Desinfektionsmittelprüfung – Suspensions- und Keimträgerversuche, mittlere Reduktionsfaktor mit Standardabweichung (Stabw) von HVAV 110 (* = Parallelversuch fehlt, NWG = Nachweisgrenze log₁₀KID₅₀/ml)

HVAV 110 / Suspensionsversuche					mittlerer Reduktionsfaktor [log ₁₀ KID ₅₀ /ml]				Stabw Reduktion			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontr	15 min.	30 min.	60 min.	120 min.	15'	30'	60'	120'
Ameisensäure	0,10	4°C	7,73	0,18	0,25	0,25	0,50	0,38	0,35	0,35	0,35	0,53
		10°C	7,73	0,18	0,88	1,25	1,00	2,13	0,18	0,00	0,35	1,94
		20°C	7,73	0,18	0,40	0,50	0,25	0,38	0,21	0,35	1,06	0,18
Ameisensäure NWG ≤ 2,5 bzw. ≤ 3,1	0,25	4°C	7,43	0,11	4,63	4,63	4,63	4,63	0,53	0,53	0,53	0,53
		10°C	7,85	0,00	4,75	4,75	4,75	4,75	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	7,48	0,18	4,38	4,38	4,38	4,38	0,18	0,18	0,18	0,18
Ameisensäure NWG ≤ 3,1	0,50	4°C	7,60	0,00	4,50	4,50	4,50	4,50	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	7,23	0,53	4,13	4,13	4,13	4,13	0,53	0,53	0,53	0,53
		20°C	7,73	0,18	4,63	4,63	4,63	4,63	0,18	0,18	0,18	0,18
Ameisensäure NWG ≤ 3,1	1	4°C	7,60	0,00	4,50	4,50	4,50	4,50	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	6,60	0,35	3,50	3,50	3,50	3,50	0,35	0,35	0,35	0,35
		20°C	7,73	0,18	4,63	4,63	4,63	4,63	0,18	0,18	0,18	0,18
Formalin	1	4°C	7,48	1,24	1,00	2,13	3,25	3,38	0,35	0,88	1,41	1,24
		10°C	7,60	0,71	1,75	2,13	2,88	3,50	0,00	0,18	0,18	0,71
		20°C	7,35	1,06	1,63	3,00	3,25	3,13	0,53	1,06	1,06	1,24
Formalin NWG ≤ 4,1	3	4°C	8,10	0,71	2,13	4,00	4,00	4,00	0,18	0,71	0,71	0,71
		10°C	7,98	0,53	3,50	3,75	3,88	3,88	0,00	0,35	0,53	0,53
		20°C	7,98	0,18	3,88	3,88	3,88	3,88	0,18	0,18	0,18	0,18
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG ≤ 3,1 bzw. 4,1	0,025	4°C	7,60	0,35	1,50	1,75	2,25	3,25	0,00	0,35	0,35	0,00
		10°C *	7,85		2,75	2,75	3,00	3,50				
		20°C	7,60	0,00	3,88	4,00	3,90	4,00	0,18	0,71	0,57	0,71
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG ≤ 3,1 - ≤ 4,1	0,05	4°C	7,60	0,35	3,50	3,75	3,63	3,50	0,35	0,00	0,18	0,35
		10°C *	7,85		4,25	4,50	3,75	4,54				
		20°C	7,60	0,00	4,00	4,00	4,00	4,00	0,71	0,71	0,71	0,71

HVAV 110 / Suspensionsversuche					mittlerer Reduktionsfaktor [\log_{10} KID ₅₀ /ml]				Stabw Reduktion			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontr	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG \leq 4,1	0,10	4°C	7,48	0,18	3,38	3,38	3,38	3,38	0,18	0,18	0,18	0,18
		10°C	7,73	0,18	3,63	3,63	3,63	3,63	0,18	0,18	0,18	0,18
		20°C	7,60	0,00	3,50	3,50	3,50	3,50	0,00	0,00	0,00	0,00
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex	0,25	4°C	7,60	0,00	2,88	2,75	2,38	2,88	0,18	0,35	0,18	0,53
		10°C										
		20°C *	8,60		3,00	4,00	3,50	4,00				
Polyvinylpyrrolidone- Iod-Komplex	0,50	4°C	7,35	0,35	3,13	3,38	3,25	3,00	0,18	0,18	0,00	0,00
		10°C										
		20°C *	8,60		3,50	4,50	4,75	5,00				
Kalkmilch NWG \leq 3,1	pH 12	4°C	7,60	0,35	4,25	4,13	4,38	4,50	0,71	0,88	0,53	0,35
		10°C	7,48	0,53	4,13	4,38	4,25	4,38	0,88	0,53	0,71	0,53
		20°C	8,10	0,35	4,75	5,00	5,00	5,00	0,00	0,35	0,35	0,35
Peressigsäure	0,01	4°C	7,60	0,35	1,00	2,13	3,25	3,38	0,18	0,18	0,00	0,18
		10°C	7,85	0,00	0,88	1,00	0,75	1,50	0,88	0,35	0,71	0,35
		20°C	8,10	0,35	1,13	1,38	1,25	1,25	0,53	0,53	0,00	0,35
Peressigsäure NWG \leq 3,1	0,025	4°C	7,60	0,00	1,75	1,25	1,50	1,75	0,35	0,35	0,00	0,71
		10°C	7,35	0,35	4,25	4,25	4,25	4,25	0,35	0,35	0,35	0,35
		20°C	7,98	0,18	4,88	4,88	4,88	4,88	0,18	0,18	0,18	0,18
Peressigsäure NWG \leq 3,1	0,05	4°C	7,48	0,18	4,38	4,38	4,38	4,38	0,18	0,18	0,18	0,18
		10°C	7,35	0,35	4,25	4,25	4,25	4,25	0,35	0,35	0,35	0,35
		20°C	7,98	0,18	4,88	4,88	4,88	4,88	0,18	0,18	0,18	0,18
Peressigsäure NWG \leq 3,1	0,1	4°C	7,48	0,18	4,38	4,38	4,38	4,38	0,18	0,18	0,18	0,18
		10°C	7,35	0,35	4,25	4,25	4,25	4,25	0,35	0,35	0,35	0,35
		20°C	7,98	0,18	4,38	4,38	4,88	4,88	0,88	0,88	0,18	0,18

HVAV 110 / Keimträgerversuche					mittlerer Reduktionsfaktor [\log_{10} KID ₅₀ /ml]				Stabw Reduktion			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontr	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Ameisensäure NWG ≤ 1,5	0,10	4°C	6,25	0,35	2,63	5,25	5,25	5,25	0,00	0,53	0,53	0,53
		10°C										
		20°C										
Formalin NWG ≤ 1,5	1	4°C										
		10°C										
		20°C	6,63	0,32	1,25	1,94	4,50	4,63	0,18	0,80	1,24	1,06
Formalin NWG ≤ 1,5 - 2.5		4°C										
		10°C										
		20°C	6,75	0,46	3,13	4,56	4,75	4,56	0,00	0,09	0,18	0,09
Peressigsäure NWG ≤ 1,5	0,010	4°C										
		10°C										
		20°C										
Peressigsäure NWG ≤ 1,0 - 1,5	0,025	4°C	6,00	0,35	4,50	4,50	4,50	4,50	0,35	0,35	0,35	0,35
		10°C										
		20°C	6,69	0,47	4,50	5,19	5,69	5,69	0,71	0,27	0,97	0,97

Tabelle A18: Ergebnisse der Desinfektionsmittelprüfung – Suspensions- und Keimträgerversuche, Virustiter der "Resttitration" mit Standardabweichung (Stabw) von KHV-T (NWG = Nachweisgrenze $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$)

KHV-T / Suspensionsversuche					VT der "Restvirustitration" [$\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$]				Stabw Titer			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw 15'Kontr.	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Ameisensäure NWG $\leq 3,1$	0,1	4°C	6,35	0,71	4,60	3,85	3,23	3,10	0,71	0,71	0,18	0,00
		10°C	6,60	0,35	4,23	3,73	4,60	3,73	0,18	0,88	0,71	0,53
		20°C	6,48	0,53	4,48	3,85	3,23	3,23	0,18	0,71	0,18	0,18
Ameisensäure NWG $\leq 3,1$	0,25	4°C	5,98	0,18	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	5,98	0,53	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	6,48	0,53	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Formalin NWG $\leq 4,1$	1	4°C	5,98	0,18	5,48	4,10	4,23	4,10	0,18	0,00	0,18	0,00
		10°C	6,48	0,18	5,98	4,48	4,23	4,10	0,18	0,18	0,18	0,00
		20°C	6,60	0,35	4,10	4,10	4,10	4,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Formalin NWG $\leq 5,1$	3	4°C	5,98	0,18	5,10	5,10	5,10	5,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	6,48	0,18	5,10	5,10	5,10	5,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	6,60	0,35	5,10	5,10	5,10	5,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 3,1$	0,025	4°C	6,10	0,35	6,23	6,10	5,73	5,73	0,18	0,35	0,18	0,18
		10°C	7,10	0,35	5,98	5,10	4,73	4,60	1,24	0,71	0,18	0,71
		20°C	6,85	0,00	4,10	3,98	3,48	3,10	0,35	0,18	0,18	0,00
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 3,1$ bzw. 3.85	0,05	4°C	6,23	0,18	3,10	3,10	3,10	3,48	0,00	0,00	0,00	0,53
		10°C	7,10	0,35	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	6,85	0,00	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex	75 ppm	4°C	5,23	0,88	5,23	5,23	5,35	4,98	0,88	0,88	1,06	0,88
		10°C	7,10	0,35	6,98	6,48	6,60	6,60	0,18	0,18	0,00	0,71
		20°C	6,35	0,71	5,73	6,23	6,35	6,10	0,53	0,53	0,71	0,71
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex	0,10	4°C	6,73	0,53	5,85	5,73	5,73	5,35	1,41	1,59	0,88	1,77
		10°C	6,85	0,00	6,23	6,23	5,48	6,10	0,18	0,18	0,18	0,00
		20°C	6,60	0,35	5,98	5,85	5,85	5,60	0,53	0,35	0,35	0,35

KHV-T / Suspensionsversuche					VT der "Restvirustitration" [log ₁₀ KID ₅₀ /ml]				Stabw Titer			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw 15'Kontr.	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex NWG ≤ 3,1 bzw. 4.1	0,25	4°C	6,73	0,53	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	6,85	0,00	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	6,60	0,35	4,10	3,35	3,10	3,10	0,71	0,18	0,00	0,00
Kalkmilch NWG ≤ 3,1	pH 12	4°C	6,10	0,00	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	7,23	0,53	3,60	3,10	3,10	3,10	0,71	0,00	0,00	0,00
		20°C	6,10	1,41	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Peressigsäure	0,010	4°C	5,73	0,18	5,48	5,23	4,73	4,98	0,18	0,18	0,18	0,18
		10°C	5,85	0,35	5,60	5,48	5,10	5,10	0,00	0,53	0,35	0,00
		20°C	5,48	0,53	5,35	5,23	5,10	5,10	0,35	0,18	0,00	0,00
Peressigsäure NWG ≤ 3,1	0,025	4°C	5,73	0,18	3,85	3,85	3,48	3,23	0,00	0,00	0,53	0,18
		10°C	5,85	0,35	3,98	4,10	3,60	3,48	0,53	0,71	0,35	0,53
		20°C	6,85	0,00	4,10	4,85	4,60	4,48	0,00	0,00	0,35	0,18
Peressigsäure NWG ≤ 3,1	0,05	4°C	5,73	0,18	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	5,85	0,35	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	6,35	0,71	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
KHV-T / Keimträgerversuche					VT der "Restvirustitration" [log ₁₀ KID ₅₀ /ml]				Stabw Titer			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontrolle	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Ameisensäure NWG ≤ 0,5 - 1,5	0,25	4°C	4,38	0,60	2,38	1,56	1,50	1,50	1,03	0,13	0,00	0,00
		10°C	5,19	0,31	4,00	1,13	0,44	1,00	0,87	0,75	0,13	0,58
		20°C	5,00	0,00	1,63	1,50	1,50	1,50	0,43	0,00	0,00	0,00
Ameisensäure NWG ≤ 1,5	0,5	4°C	4,75	0,54	1,50	1,50	1,50	1,50	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	5,50	0,54	1,50	1,44	1,50	1,50	0,00	0,13	0,00	0,00
		20°C	4,88	0,32	2,25	1,50	1,50	1,50	1,06	0,00	0,00	0,00

KHV-T / Keimträgerversuche					VT der "Restvirustitration" [\log_{10} KID ₅₀ /ml]				Stabw Titer			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontrolle	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Formalin NWG $\leq 2,5$	1	4°C	4,44	0,31	4,13	3,94	3,49	2,56	0,32	0,43	0,47	0,13
		10°C	5,19	0,38	4,25	4,38	3,56	2,50	0,58	0,48	0,75	0,00
		20°C	4,94	0,24	4,50	4,00	2,69	2,50	0,20	0,68	0,38	0,00
Formalin NWG $\leq 2,5 - 4,5$	3	4°C	5,19	0,43	3,63	4,06	4,31	3,56	1,05	0,52	0,43	0,13
		10°C	5,00	0,29	3,13	3,00	3,00	3,00	0,95	0,58	0,58	0,58
		20°C	4,69	0,75	3,31	3,00	3,50	3,13	0,94	0,58	0,00	0,48
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 1,5$	0,05	4°C	4,75	0,35	3,38	3,13	2,38	2,06	0,25	0,72	0,48	0,83
		10°C	5,00	0,35	3,69	2,75	1,81	1,50	1,33	1,06	0,47	0,00
		20°C	5,13	0,25	3,44	3,19	1,50	1,50	0,75	1,28	0,00	0,00
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 1.25 - 2.5$	0,1	4°C	4,56	0,52	2,06	1,69	1,75	2,00	0,55	0,55	0,50	0,58
		10°C	5,13	0,25	2,06	1,50	1,50	1,50	1,13	0,00	0,00	0,00
		20°C	5,31	0,43	1,75	1,50	2,00	2,00	0,50	0,00	0,58	0,58
Polyvinylpyrrolidon- Iodi-Komplex NWG $\leq 0.5 - 1.5$	0,25	4°C	4,69	0,13	4,50	4,50	3,50	1,69	0,65	0,61	0,58	1,07
		10°C	4,50	0,00	4,06	2,81	3,19	2,31	0,55	0,47	0,47	0,72
		20°C	5,31	0,52	4,63	4,63	3,69	2,19	0,43	0,25	0,75	1,07
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex NWG $\leq 0.5 - 1.5$	0,5	4°C	4,63	0,14	4,13	4,25	3,88	2,63	0,52	0,20	0,43	0,75
		10°C	5,44	0,24	5,44	4,75	5,19	2,88	0,38	0,29	0,31	1,03
		20°C	4,94	0,38	4,75	4,31	1,56	1,00	0,46	0,38	1,53	0,58
Kalkmilch	pH 12	4°C	4,63	0,43	4,38	4,75	4,63	4,88	0,92	0,54	0,52	0,48
		10°C	5,13	0,25	5,38	5,19	5,19	5,31	0,25	0,80	0,55	0,52
		20°C	4,75	0,35	4,31	4,81	5,19	4,31	0,38	1,13	0,66	0,83
Peressigsäure NWG $\leq 1,5 - 2,5$	0,025	4°C	4,44	0,38	2,69	2,06	2,00	2,00	0,24	0,52	0,58	0,58
		10°C	4,44	0,13	2,19	2,19	2,50	2,50	0,47	0,55	0,00	0,00
		20°C	4,69	0,75	2,75	2,63	2,50	2,38	0,50	0,25	0,00	0,25
Peressigsäure NWG $\leq 1,5 - 2,5$	0,05	4°C	4,88	0,43	2,00	2,00	2,00	2,00	0,58	0,58	0,58	0,58
		10°C	5,19	0,31	2,69	0,94	1,19	1,00	1,23	0,66	0,80	0,58
		20°C	4,38	0,43	2,50	2,50	2,50	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle A19: Ergebnisse der Desinfektionsmittelprüfung – Suspensions- und Keimträgerversuche, mittlere Reduktionsfaktor mit Standardabweichung (Stabw) von KHV-T (NWG = Nachweisgrenze $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$)

KHV-T / Suspensionsversuche					mittlerer Reduktionsfaktor [$\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$]				Stabw Reduktion			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stab. 15'Kontr.	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Ameisensäure NWG $\leq 3,1$	0,1	4°C	6,35	0,71	1,75	2,50	3,13	3,25	1,41	1,41	0,88	0,71
		10°C	6,60	0,35	2,38	2,88	2,00	2,88	0,18	1,24	0,35	0,18
		20°C	6,48	0,53	2,00	2,63	3,25	3,25	0,35	0,18	0,35	0,35
Ameisensäure NWG $\leq 3,1$	0,25	4°C	5,98	0,18	2,88	2,88	2,88	2,88	0,18	0,18	0,18	0,18
		10°C	5,98	0,53	2,88	2,88	2,88	2,88	0,53	0,53	0,53	0,53
		20°C	6,48	0,53	3,38	3,38	3,38	3,38	0,53	0,53	0,53	0,53
Formalin NWG $\leq 4,1$	1	4°C	5,98	0,18	0,50	1,88	1,75	1,88	0,35	0,18	0,35	0,18
		10°C	6,48	0,18	0,50	2,00	2,25	2,38	0,00	0,00	0,00	0,18
		20°C	6,60	0,35	2,50	2,50	2,50	2,50	0,35	0,35	0,35	0,35
Formalin NWG $\leq 5,1$	3	4°C	5,98	0,18	0,88	0,88	0,88	0,88	0,18	0,18	0,18	0,18
		10°C	6,48	0,18	1,38	1,38	1,38	1,38	0,18	0,18	0,18	0,18
		20°C	6,60	0,35	1,50	1,50	1,50	1,50	0,35	0,35	0,35	0,35
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 3,1$	0,025	4°C	6,10	0,35	-0,13	0,00	0,38	0,38	0,53	0,71	0,18	0,53
		10°C	7,10	0,35	1,13	2,00	2,38	2,50	1,59	1,06	0,53	1,06
		20°C	6,85	0,00	2,75	2,88	3,38	3,75	0,35	0,18	0,18	0,00
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 3,1$ bzw. 3.85	0,05	4°C	6,23	0,18	3,13	3,13	3,13	2,75	0,18	0,18	0,18	0,71
		10°C	7,10	0,35	4,00	4,00	4,00	4,00	0,35	0,35	0,35	0,35
		20°C	6,85	0,00	3,75	3,75	3,75	3,75	0,00	0,00	0,00	0,00
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex	75 ppm	4°C	5,23	0,88	0,00	0,00	-0,13	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	7,10	0,35	0,13	0,63	0,50	0,50	0,18	0,18	0,35	0,35
		20°C	6,35	0,71	0,63	0,13	0,00	0,25	0,18	0,18	0,00	0,00
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex	0,10	4°C	6,73	0,53	0,88	1,00	1,00	1,38	0,88	1,06	0,35	1,24
		10°C	6,85	0,00	0,63	0,63	1,38	0,75	0,18	0,18	0,18	0,00
		20°C	6,60	0,35	0,63	0,75	0,75	1,00	0,88	0,71	0,00	0,00

KHV-T / Suspensionsversuche					mittlerer Reduktionsfaktor [$\log_{10}KID_{50}/ml$]				Stabw Reduktion			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw 15'Kontr.	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex NWG $\leq 3,1$ bzw. 4.1	0,25	4°C	6,73	0,53	3,63	3,63	3,63	3,63	0,53	0,53	0,53	0,53
		10°C	6,85	0,00	3,75	3,75	3,75	3,75	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	6,60	0,35	3,00	3,38	3,50	3,50	0,35	0,18	0,35	0,35
Kalkmilch NWG $\leq 3,1$	pH 12	4°C	6,10	0,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	7,23	0,53	3,63	4,13	4,13	4,13	0,18	0,53	0,53	0,53
		20°C	6,10	1,41	3,00	3,00	3,00	3,00	1,41	1,41	1,41	1,41
Peressigsäure	0,010	4°C	5,73	0,18	0,25	0,50	1,00	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	5,85	0,35	0,25	0,38	0,75	0,75	0,35	0,88	0,71	0,35
		20°C	5,48	0,53	0,13	0,25	0,38	0,38	0,18	0,35	0,53	0,53
Peressigsäure NWG $\leq 3,1$	0,025	4°C	5,73	0,18	1,88	1,88	2,25	2,50	0,18	0,18	0,71	0,35
		10°C	5,85	0,35	1,88	1,75	2,25	2,38	0,88	1,06	0,00	0,88
		20°C	6,85	0,00	2,75	2,00	2,25	2,38	0,00	0,00	0,35	0,18
Peressigsäure NWG $\leq 3,1$	0,05	4°C	5,73	0,18	2,63	2,63	2,63	2,63	0,18	0,18	0,18	0,18
		10°C	5,85	0,35	2,75	2,75	2,75	2,75	0,35	0,35	0,35	0,35
		20°C	6,35	0,71	3,25	3,25	3,25	3,25	0,71	0,71	0,71	0,71
KHV-T / Keimträgerversuche					mittlere Reduktionsfaktor [$\log_{10}KID_{50}/ml$]				Stabw Reduktion			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stab. Kontrolle	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Ameisensäure NWG $\leq 0,5 - 1,5$	0,25	4°C	4,38	0,60	2,00	2,81	2,88	2,88	0,18	0,44	0,35	0,35
		10°C	5,19	0,31	1,19	4,06	4,75	4,19	0,62	0,97	0,00	0,80
		20°C	5,00	0,00	3,38	3,50	3,50	3,50	0,18	0,00	0,00	0,00
Ameisensäure NWG $\leq 1,5$	0,5	4°C	4,75	0,54	3,25	3,25	3,25	3,25	0,53	0,53	0,53	0,53
		10°C	5,50	0,54	4,00	4,06	4,00	4,00	0,35	0,44	0,35	0,35
		20°C	4,88	0,32	2,63	3,38	3,38	3,38	0,88	0,18	0,18	0,18

KHV-T / Keimträgerversuche					mittlere Reduktionsfaktor [\log_{10} KID ₅₀ /ml]				Stabw Reduktion			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontrolle	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Formalin NWG $\leq 2,5$	1	4°C	4,44	0,31	0,31	0,50	0,95	1,88	0,44	0,00	0,81	0,35
		10°C	5,19	0,38	0,94	0,81	1,63	2,69	0,09	0,09	0,18	0,09
		20°C	4,94	0,24	0,44	0,94	2,25	2,44	0,09	0,80	0,53	0,27
Formalin NWG $\leq 2,5 - 4,5$	3	4°C	5,19	0,43	1,56	1,13	0,88	1,63	0,97	0,88	0,71	0,18
		10°C	5,00	0,29	1,88	2,00	2,00	2,00	0,53	0,35	0,35	0,35
		20°C	4,69	0,75	1,38	1,69	1,19	1,56	0,35	0,09	0,80	0,27
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 1,5$	0,05	4°C	4,75	0,35	1,38	1,63	2,38	2,69	0,18	0,53	0,18	0,09
		10°C	5,00	0,35	1,31	2,25	3,19	3,50	0,80	1,24	0,62	0,35
		20°C	5,13	0,25	1,69	1,94	3,63	3,63	0,09	0,09	0,18	0,18
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 1,25 - 2,5$	0,1	4°C	4,56	0,52	2,50	2,88	2,81	2,56	0,00	0,18	0,97	1,33
		10°C	5,13	0,25	3,06	3,63	3,63	3,63	0,62	0,18	0,18	0,18
		20°C	5,31	0,43	3,56	3,81	3,31	3,31	0,80	0,44	0,27	0,27
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex NWG $\leq 0,5 - 1,5$	0,25	4°C	4,69	0,13	0,19	0,19	1,19	3,00	0,62	0,62	0,09	1,24
		10°C	4,50	0,00	0,44	1,69	1,31	2,19	0,62	0,27	0,27	0,80
		20°C	5,31	0,52	0,69	0,69	1,63	3,13	0,09	0,27	0,53	1,41
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex NWG $\leq 0,5 - 1,5$	0,5	4°C	4,63	0,14	0,50	0,38	0,75	2,00	0,35	0,00	0,18	0,71
		10°C	5,44	0,24	0,00	0,69	0,25	2,56	0,71	0,09	0,00	1,15
		20°C	4,94	0,38	0,19	0,63	3,38	3,94	0,62	0,35	1,59	0,80
Kalkmilch	pH 12	4°C	4,63	0,43	0,25	-0,13	0,00	-0,25	0,53	0,00	0,00	0,00
		10°C	5,13	0,25	-0,25	-0,06	-0,06	-0,19	0,00	0,80	0,44	0,44
		20°C	4,75	0,35	0,44	-0,06	-0,44	0,44	0,09	0,97	0,27	0,62
Peressigsäure NWG $\leq 1,5 - 2,5$	0,025	4°C	4,44	0,38	1,75	2,38	2,44	2,44	0,35	1,06	1,15	0,27
		10°C	4,44	0,13	2,25	2,25	1,94	1,94	0,53	0,71	0,09	0,09
		20°C	4,69	0,75	1,94	2,06	2,19	2,31	0,44	0,62	0,80	0,97
Peressigsäure NWG $\leq 1,5 - 2,5$	0,05	4°C	4,88	0,43	2,88	2,88	2,88	2,88	1,24	1,24	1,24	1,24
		10°C	5,19	0,31	2,50	4,25	4,00	4,19	0,88	0,88	1,06	0,80
		20°C	4,38	0,43	1,88	1,88	1,88	1,88	0,18	0,18	0,18	0,18

Tabelle A20: Ergebnisse der Desinfektionsmittelpfung – Suspensions- und Keimträgerversuche, Virustiter der "Resttitration" mit Standardabweichung (Stabw) von VHSV 1087 (NWG = Nachweisgrenze $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$)

VHSV 1087 / Suspensionsversuche					VT der "Restvirustitration" [$\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$]				Stabw Titer			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stab. Kontr.	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Ameisensäure NWG $\leq 3,1$	0,50	4°C	6,60	0,35	5,60	5,35	4,85	4,98	0,35	0,00	0,00	0,18
		10°C	6,73	0,18	4,98	4,35	3,98	3,23	0,18	0,35	0,53	0,18
		20°C	5,98	0,53	3,73	3,10	3,10	3,10	0,53	0,00	0,00	0,00
Ameisensäure NWG $\leq 3,1$	1	4°C	6,60	0,35	4,10	3,98	3,10	3,10	0,71	1,24	0,00	0,00
		10°C	5,98	0,18	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	5,98	0,53	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Formalin	1	4°C	7,10	0,00	6,48	6,60	5,85	5,35	0,53	0,35	0,35	0,00
		10°C	6,73	0,18	5,85	5,35	4,73	4,48	0,00	0,35	0,18	0,18
		20°C	7,10	0,35	6,48	6,23	6,10	5,35	0,18	0,18	0,35	0,71
Formalin	3	4°C	6,60	0,00	6,23	6,10	5,48	5,85	0,53	0,35	1,94	
		10°C	7,10	0,35	5,98	5,60	5,60	5,60	0,18	0,71	0,00	0,00
		20°C	7,23	0,18	5,48	3,60	3,10		0,18	0,35	0,00	
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 3,1 - 4,1$	0,10	4°C	6,60	0,35	6,23	5,48	4,73	2,98	0,53	0,88	0,88	0,88
		10°C	6,60	0,00	4,60	3,85	3,48	3,35	0,35	0,71	0,18	0,35
		20°C	6,35	0,35	3,85	3,48	3,60	3,60	0,35	0,53	0,71	0,71
Didecyldimethyl- Ammoniumchlorid NWG $\leq 3,1 / \leq 4,1$	0,25	4°C	6,99	0,86	4,10	4,10	4,10	4,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	6,10	0,35	4,10	4,10	4,10	4,10	0,00	0,00	0,00	
		20°C	7,23	0,18	4,23	4,10	4,10	4,10	0,18	0,00	0,00	0,00
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex NWG $\leq 3,1$	0,10	4°C	6,35	0,35	5,60	5,10	5,10	4,73	0,71	0,00	0,35	0,18
		10°C	6,60	0,35	3,23	3,10	3,48	3,10	0,18	0,00	0,18	0,00
		20°C	6,48	0,18	5,48	5,23	5,48	5,10	0,18	0,88	0,53	0,71
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex NWG $\leq 3,1$	0,25	4°C	5,73	0,88	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	6,73	0,18	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	6,23	0,18	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00

VHSV 1087 / Suspensionsversuche					VT der "Restvirustitration" [\log_{10} KID ₅₀ /ml]				Stabw Titer			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontr.	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Kalkmilch NWG: $\leq 3,1$	pH 12	4°C	6,23	0,18	6,10	5,73	4,98	4,98	0,35	0,88	1,24	1,24
		10°C	6,35	0,71	6,60	5,60	5,10	3,35	0,00	0,35	0,00	0,35
		20°C	6,23	0,18	5,35	4,85	3,85	3,23	0,00	0,35	0,35	0,18
Peressigsäure NWG $\leq 3,1 - 4,1$	0,025	4°C	6,10	0,35	4,23	4,23	4,35	4,23	0,18	0,18	0,71	0,53
		10°C	6,48	0,18	3,35	3,23	3,73	3,10	0,00	0,18	0,53	0,00
		20°C	6,30	0,07	4,73	4,48	4,48	4,23	0,88	0,88	0,53	0,53
Peressigsäure NWG $\leq 3,1$	0,05	4°C	6,35	0,71	4,10	3,98	3,48	3,10	1,06	1,24	0,53	0,00
		10°C	6,85	0,35	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	5,55	1,34	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Peressigsäure NWG $\leq 3,1$	0,10	4°C	6,35	0,71	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	6,60	0,00	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	5,55	1,34	3,10	3,10	3,10	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
VHSV 1087 / Keimträgerversuche					VT der "Restvirustitration" [\log_{10} KID ₅₀ /ml]				Stabw Titer			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontr.	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Ameisensäure NWG $\leq 0,5 / \leq 1,5$	0,50	4°C	4,88	0,43	1,56	1,50	1,00	0,88	1,53	0,41	0,58	0,48
		10°C	5,00	0,35	1,94	1,50	1,00	0,50	1,01	1,24	1,00	0,00
		20°C	4,63	0,32	0,81	0,50	0,50	1,00	0,63	0,00	0,00	0,58
Ameisensäure NWG $\leq 0,5 - 1,5$	1	4°C	4,88	0,43	1,38	1,31	1,50	1,50	0,97	0,38	0,00	0,00
		10°C	4,63	0,25	1,50	1,50	1,50	1,50	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	4,44	0,77	1,06	1,50	1,50	1,50	0,52	0,00	0,00	0,00
Formalin NWG $\leq 2,5$	1	4°C	3,69	0,47	2,50	2,50	2,50	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00
		10°C	4,44	0,52	2,63	2,50	2,56	2,50	0,14	0,41	0,13	0,00
		20°C	3,69	0,13	2,50	2,50	2,50	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00

VHSV 1087 / Keimträgerversuche					VT der "Restvirustitration" [$\log_{10}KID_{50}/ml$]				Stabw Titer			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp .	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontr.	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 1,5 - 2,5$	0,25	4°C	4,44	0,31	3,25	2,25	1,75	1,50	1,19	0,65	0,50	0,00
		10°C	4,88	0,25	1,69	1,63	1,81	1,50	0,38	0,25	0,63	0,00
		20°C	4,81	0,47	2,75	1,94	2,44	2,31	1,15	0,88	0,83	0,55
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex NWG $\leq 0,5 - 1,5$	0,25	4°C	4,25	0,65	3,63	3,25	2,81	0,81	0,32	0,68	1,01	0,24
		10°C	4,75	0,20	3,81	3,88	2,31	1,31	0,31	0,14	1,01	0,38
		20°C	4,88	0,25	4,25	4,25	2,88	0,69	0,35	0,61	1,01	0,38
Kalkmilch	pH 12	4°C	4,19	0,55	4,63	4,94	4,44	4,31	0,25	0,24	0,66	0,69
		10°C	4,88	0,25	4,50	4,69	4,81	4,56	0,35	0,24	0,13	0,43
		20°C	4,38	0,60	4,31	3,88	4,38	2,69	0,43	0,43	0,32	1,14
Peressigsäure NWG $\leq 0,5 - 1,5$	0,05	4°C	4,50	0,41	1,31	1,50	1,50	1,00	0,38	0,00	0,00	0,58
		10°C	3,75	1,31	1,00	1,00	1,00	1,00	0,58	0,58	0,58	0,58
		20°C	4,56	0,31	1,13	1,00	1,00	1,00	1,00	0,48	0,58	0,58

Tabelle A21: Ergebnisse der Desinfektionsmittelpfung – Suspensions- und Keimträgerversuche, mittlere Reduktionsfaktor mit Standardabweichung (Stabw) von VHSV 1087 (NWG = Nachweisgrenze \log_{10} KID₅₀/ml)

VHSV 1087 / Suspensionsversuche					mittlerer Reduktionsfaktor [\log_{10} KID ₅₀ /ml]				Stabw Reduktion			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontr.	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Ameisensäure NWG $\leq 3,1$	0,50	4°C	6,60	0,35	1,00	1,25	1,75	1,63	0,71	0,35	0,35	0,18
		10°C	6,73	0,18	1,75	2,38	2,75	3,50	0,00	0,18	0,35	0,00
		20°C	5,98	0,53	2,25	2,88	2,88	2,88	0,00	0,53	0,53	0,53
Ameisensäure NWG $\leq 3,1$	1	4°C	6,60	0,35	2,50	2,63	3,50	3,50	1,06	1,59	0,35	0,35
		10°C	5,98	0,18	2,88	2,88	2,88	2,88	0,18	0,18	0,18	0,18
		20°C	5,98	0,53	2,88	2,88	2,88	2,88	0,53	0,53	0,53	0,53
Formalin	1	4°C	7,10	0,00	0,63	0,50	1,25	1,75	0,53	0,35	0,35	0,00
		10°C	6,73	0,18	0,88	1,38	2,00	2,25	0,18	0,53	0,35	0,00
		20°C	7,10	0,35	0,63	0,88	1,00	1,75	0,53	0,53	0,71	0,35
Formalin	3	4°C	6,60	0,00	0,38	0,50	1,13	0,75	0,53	0,35	1,94	
		10°C	7,10	0,35	1,13	1,50	1,50	1,50	0,18	0,35	0,35	0,35
		20°C	7,23	0,18	1,75	3,63	4,13		0,00	0,53	0,18	
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 3,1 - 4,1$	0,10	4°C	6,60	0,35	0,38	1,13	1,88	3,63	0,18	0,53	0,53	1,24
		10°C	6,60	0,00	2,00	2,75	3,13	3,25	0,35	0,71	0,18	0,35
		20°C	6,35	0,35	2,50	2,88	2,75	2,75	0,71	0,88	1,06	1,06
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 3,1 / \leq 4,1$	0,25	4°C	6,99	0,86	2,89	2,89	2,89	2,89	0,86	0,86	0,86	0,86
		10°C	6,10	0,35	2,00	2,00	2,00	2,25	0,35	0,35	0,35	
		20°C	7,23	0,18	3,00	3,13	3,13	3,13	0,35	0,18	0,18	0,18
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex NWG $\leq 3,1$	0,10	4°C	6,35	0,35	0,75	1,25	1,25	1,63	0,35	0,35	0,00	0,18
		10°C	6,60	0,35	3,38	3,50	3,13	3,50	0,53	0,35	0,18	0,35
		20°C	6,48	0,18	1,00	1,25	1,00	1,38	0,35	1,06	0,71	0,88
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex NWG $\leq 3,1$	0,25	4°C	5,73	0,88	2,63	2,63	2,63	2,63	0,88	0,88	0,88	0,88
		10°C	6,73	0,18	3,63	3,63	3,63	3,63	0,18	0,18	0,18	0,18
		20°C	6,23	0,18	3,13	3,13	3,13	3,13	0,18	0,18	0,18	0,18

VHSV 1087 / Suspensionsversuche					mittlerer Reduktionsfaktor [$\log_{10}KID_{50}/ml$]				Stabw Reduktion			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontr.	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Kalkmilch NWG: $\leq 3,1$	pH 12	4°C	6,23	0,18	0,13	0,50	1,25	1,25	0,53	1,06	1,41	1,41
		10°C	6,35	0,71	-0,25	0,75	1,25	3,00	0,71	0,35	0,71	1,06
		20°C	6,23	0,18	0,88	1,38	2,38	3,00	0,18	0,53	0,18	0,35
Peressigsäure NWG $\leq 3,1 - 4,1$	0,025	4°C	6,10	0,35	1,88	1,88	1,75	1,88	0,18	0,18	0,35	0,18
		10°C	6,48	0,18	3,13	3,25	2,75	3,38	0,18	0,35	0,35	0,18
		20°C	6,30	0,07	1,58	1,83	1,83	2,08	0,95	0,95	0,60	0,60
Peressigsäure NWG $\leq 3,1$	0,05	4°C	6,35	0,71	2,25	2,38	2,88	3,25	1,77	1,94	1,24	0,71
		10°C	6,85	0,35	3,75	3,75	3,75	3,75	0,35	0,35	0,35	0,35
		20°C	5,55	1,34	2,45	2,45	2,45	2,45	1,34	1,34	1,34	1,34
Peressigsäure NWG $\leq 3,1$	0,10	4°C	6,35	0,71	3,25	3,25	3,25	3,25	0,71	0,71	0,71	0,71
		10°C	6,60	0,00	3,50	3,50	3,50	3,50	0,00	0,00	0,00	0,00
		20°C	5,55	1,34	2,45	2,45	2,45	2,45	1,34	1,34	1,34	1,34
VHSV 1087 / Keimträgerversuche					mittlere Reduktionsfaktor [$\log_{10}KID_{50}/ml$]				Stabw Reduktion			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stab. Kontr.	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Ameisensäure NWG $\leq 0,5 / \leq 1,5$	0,50	4°C	4,88	0,43	3,31	3,38	3,88	4,00	0,80	0,35	0,71	0,53
		10°C	5,00	0,35	3,06	3,50	4,00	4,50	0,97	0,18	1,06	0,35
		20°C	4,63	0,32	3,81	4,13	4,13	3,63	0,44	0,00	0,00	0,71
Ameisensäure NWG $\leq 0,5 - 1,5$	1	4°C	4,88	0,43	3,50	3,56	3,38	3,25	0,53	0,44	0,18	
		10°C	4,63	0,25	3,13	3,13	3,13	3,13	0,18	0,18	0,18	0,18
		20°C	4,44	0,77	3,38	2,94	2,94	2,94	0,18	0,80	0,80	0,80
Formalin NWG $\leq 2,5$	1	4°C	3,69	0,47	1,19	1,19	1,19	1,19	0,27	0,27	0,27	0,27
		10°C	4,44	0,52	1,81	1,94	1,88	1,94	0,27	0,09	0,18	0,09
		20°C	3,69	0,13	1,19	1,19	1,19	1,19	0,09	0,09	0,09	0,09

VHSV 1087 / Keimträgerversuche					mittlerer Reduktionsfaktor [$\log_{10}KID_{50}/ml$]				Stabw Reduktion			
Desinfektionsmittel	Konz. [%]	Temp.	Virustiter 15'Kontr.	Stabw Kontr.	15 min	30 min	60 min	120 min	15'	30'	60'	120'
Didecyldimethyl- ammoniumchlorid NWG $\leq 1,5 - 2,5$	0,25	4°C	4,44	0,31	1,19	2,19	2,69	2,94	0,27	0,27	0,09	0,27
		10°C	4,88	0,25	3,19	3,25	3,06	3,38	0,44	0,35	0,62	0,18
		20°C	4,81	0,47	2,06	2,88	2,38	2,50	0,27	0,35	0,18	0,53
Polyvinylpyrrolidon- Iod-Komplex NWG $\leq 0,5 - 1,5$	0,25	4°C	4,25	0,65	0,63	1,00	1,44	3,44	0,53	0,18	1,15	0,62
		10°C	4,75	0,20	0,94	0,88	2,44	3,44	0,09	0,35	1,15	0,09
		20°C	4,88	0,25	0,63	0,63	2,00	4,19	0,35	0,88	1,24	0,44
Kalkmilch	pH 12	4°C	4,19	0,55	-0,44	-0,75	-0,25	-0,13	0,09	0,18	0,35	0,71
		10°C	4,88	0,25	0,38	0,19	0,06	0,31	0,00	0,27	0,27	0,09
		20°C	4,38	0,60	0,06	0,50	0,00	1,69	0,27	1,06	0,35	0,62
Peressigsäure NWG $\leq 0,5 - 1,5$	0,05	4°C	4,50	0,41	3,19	3,00	3,00	3,50	0,09	0,35	0,35	0,35
		10°C	3,75	1,31	2,75	2,75	2,75	2,75	0,71	0,71	0,71	0,71
		20°C	4,56	0,31	3,44	3,56	3,56	3,56	0,80	0,97	0,97	0,97

Tabelle A22: Daten - Feststellung der Resistenz der Viren gegenüber Trocknung, Mittelwerte (MW) der Virustiter $\log_{10}KID_{50}/ml$ und Standardabweichung (Stabw)

	Keimträger (MW \log_{10}-Wert)					
	HVAV 110					
	Metall	Stabw	Holz	Stabw	Filter (Virosorb)	Stabw
Virus + FKS	7,48	0,18		0,71	7,05	0,42
t₀	5,93	0,00	5,00		4,52	0,12
45 min	2,45	0,38		0,71	2,35	
60 min	1,56	0,06	2,00		1,10	0,00
90 min	1,39	0,18	1,50	0,00	1,10	0,00
	Keimträger (MW \log_{10}-Wert)					
	KHV-T					
	Metall	Stabw	Holz	Stabw	Filter (Virosorb)	Stabw
Virus + FKS	6,23	0,53	5,75		5,98	0,18
t₀	4,27	0,47			3,48	0,06
45 min	2,23	1,12	4,50		2,23	1,59
60 min	1,98	0,29	4,67		1,56	0,65
90 min	1,14	0,06	5,08		1,10	0,00
	Keimträger (MW \log_{10}-Wert)					
	VHSV 1087					
	Metall	Stabw	Holz	Stabw	Filter (Virosorb)	Stabw
Virus + FKS	6,35		6,85	0,71	6,35	
t₀	5,18				3,18	
45 min.	4,60		5,23	0,35	2,52	
60 min	3,35				2,85	
90 min	3,18				2,77	

Tabelle A23: Daten – Feststellung der Resistenz gegenüber Wärmeinaktivierung von HVAV 110 und KHV-T, Mittelwerte (MW) der Virustiter $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ und Standardabweichung (Stabw), zur Berechnung der linearen Regression wurde die Nachweisgrenze von $\leq 0,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ gleich Null gesetzt

HVAV 110				KHV-T			
Temperatur	Zeit [min]	MW \log_{10} -Wert	Stabw	Temperatur	Zeit [min]	MW \log_{10} -Wert	Stabw
25°C	0	6,75		25°C	0	6,75	
	Tag 1	8,50	0,00		Tag 1	6,33	0,38
	Tag 3	7,42	0,14		Tag 3	6,00	0,00
	Tag 6				Tag 6	5,75	0,25
	Tag 9	6,25	0,25		Tag 9	5,50	0,00
	Tag 12	4,75	0,43		Tag 12	4,75	0,25
	Tag 15	4,38	0,18		Tag 15	4,75	0,50
	Tag 18	3,33	0,29		Tag 18	3,67	0,38
	Tag 21			Tag 21	3,33	0,14	
40°C	0	6,75		40°C	0	6,75	
	15	6,42	0,14		15	6,50	0,25
	30	5,25	0,25		30	4,33	0,14
	60	3,50	0,25		60	3,25	0,43
	120	2,58	0,14		120	3,17	1,01
55°C	0	7,00	1,09	55°C	0	6,58	0,38
	1	7,25	0,25		1	6,75	0,25
	2	7,50	0,43		2	5,50	0,25
	3	4,17	0,58		3	2,42	2,02
	4	4,25	0,66		4	2,08	1,53
	5	1,00	0,87		5	0,42	0,72
	10	0,67	0,58		10	0,25	0,43
70°C	0	7,50		70°C	0	7,50	
	1	7,67	0,38		1	5,75	0,25
	2	3,17	0,58		2	4,17	0,38
	3	3,50	1,15		3	0,42	0,72
	4	3,42	0,88		4	1,50	2,60
	5	1,50	0,00		5	0,00	0,00
	10	0,50	0,87		10	1,75	2,41

Tabelle A24: Daten – Feststellung der Resistenz gegenüber Wärmeinaktivierung von VHSV 1087 und IHNV, Mittelwerte (MW) der Virustiter $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ und Standardabweichung (Stabw), zur Berechnung der linearen Regression wurde die Nachweisgrenze von $\leq 0,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ gleich Null gesetzt

VHSV 1087				IHNV			
Temperatur	Zeit [min.]	MW \log_{10} -Wert	Stabw	Temperatur	Zeit [min.]	MW \log_{10} -Wert	Stabw
25°C	0	6,75		25°C	0	7,33	0,14
	Tag 1	6,58	0,29		Tag 1	7,00	0,25
	Tag 3	5,67	0,14		Tag 3	6,17	0,29
	Tag 6				Tag 6	6,17	0,14
	Tag 9				Tag 9	5,33	0,38
	Tag 12	1,33	1,26		Tag 12	3,75	0,25
	Tag 15	2,50	0,00		Tag 15	1,50	0,50
	Tag 18				Tag 18	2,33	0,14
	Tag 21				Tag 21	2,08	0,14
40°C	0	6,75		40°C			
	15	5,25	0,25				
	30	3,50	0,66				
	60	0,00	0,00				
	120	0,00	0,00				
55°C	0	6,75		55°C			
	1	7,33	0,76				
	2	6,58	0,38				
	3	3,75	0,43				
	4	3,08	0,38				
	5	2,33	1,04				
	10	0,83	0,76				
70°C	0	7,50		70°C			
	1	5,67	0,14				
	2	3,33	0,14				
	3	0,33	0,58				
	4	1,50	1,32				
	5	0,00	0,00				
	10	0,00	0,00				

Tabelle A25: Daten – Feststellung der Resistenz gegenüber Wärmeinaktivierung, lineare Regression und daraus berechnete D-90 Werte

25 °C				
	HVAV 110	KHV-T	VHSV 1087	IHNV
Regression	$y = -0,2412x + 7,9095$	$y = -0,1522x + 6,6409$	$y = -0,3452x + 6,7069$	$y = -0,2832x + 7,3043$
Bestimmtheitsmaß R²	0,8767	0,97	0,90	0,91
D-90 (10¹KID₅₀/ml) in Tagen	4,15	6,57	2,90	3,53
D-90 (10⁶KID₅₀/ml) in Tagen	24,88	39,42	17,38	21,19
40 °C				
	HVAV 110	KHV-T	VHSV 1087	IHNV
Regression	$y = -0,0365x + 6,5438$	$y = -0,0308x + 6,1875$	$y = -0,1133x + 6,85$	
Bestimmtheitsmaß R²	0,91	0,71	1,00	
D-90 (10¹KID₅₀/ml) in Minuten	27,40	32,47	8,83	
D-90 (10⁶KID₅₀/ml) in Minuten	164,38	194,81	52,96	
55°C				
	HVAV 110	KHV-T	VHSV 1087	IHNV
Regression	$y = -0,765x + 7,2799$	$y = -0,7274x + 6,0263$	$y = -0,6915x + 6,8505$	
Bestimmtheitsmaß R²	0,77	0,74	0,83	
D-90 (10¹KID₅₀/ml) in Minuten	1,31	1,37	1,45	
D-90 (10⁶KID₅₀/ml) in Minuten	7,84	8,25	8,68	
70°C				
	HVAV 110	KHV-T	VHSV 1087	IHNV
Regression	$y = -0,71x + 6,4284$	$y = -0,5549x + 4,9937$	$y = -1,5143x + 6,8413$	
Bestimmtheitsmaß R²	0,7296	0,4158	0,8759	
D-90 (10¹KID₅₀/ml) in Minuten	1,41	1,80	0,66	
D-90 (10⁶KID₅₀/ml) in Minuten	8,45	10,81	3,96	

Tabelle A26: Geschätzte Persistenz von KHV-T unter Laborbedingungen mit bei pH 11/12 und 4°C mit Oberflächenwasser/Sediment aus einer Aquakulturanlage (D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine log₁₀-Stufe = 90% der Virusbelastung, MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung, BK = Branntkalk, LK = Löschkalk)

pH 11											
Teichlevel	BK 1	BK 2	BK 3	MW	Stabw	Teichlevel	LK 1	LK 2	LK3	MW	Stabw
				D-90 Wert						D-90 Wert	
Wasser	1,37	2,21	1,19	1,59	0,54	Wasser	2,19	2,00	1,75	1,98	0,22
Sed.-Oberfl.	1,58	2,02	0,99	1,53	0,52	Sed.-Oberfl.	2,60	2,03	0,88	1,84	0,88
Sed.- 3 cm	7,45	8,04	1,42	5,64	3,66	Sed.- 3 cm	3,59	7,57	2,78	4,65	2,56
pH 12											
Teichlevel	BK 1	BK 2	BK 3	MW	Stabw	Teichlevel	LK 1	LK 2	LK3	MW	Stabw
				D-90 Wert						D-90 Wert	
Wasser	2,03	1,23	1,02	1,43	0,53	Wasser	1,25	1,37	1,02	1,21	0,18
Sed.-Oberfl.	0,87	1,45	0,60	0,97	0,43	Sed.-Oberfl.	1,90	1,47	1,04	1,47	0,43
Sed.- 3 cm	2,71	5,28	4,33	4,11	1,30	Sed.- 3 cm		2,40	2,67	2,54	0,19

Tabelle A27: Geschätzte Persistenz von KHV-T unter Laborbedingungen mit bei pH 11/12 und 4°C mit Oberflächenwasser/Sediment aus dem Hohenheimer Eiszeitteich (D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine log₁₀-Stufe = 90% der Virusbelastung, MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung, BK = Branntkalk, LK = Löschkalk)

pH 11											
Teichlevel	BK 1	BK 2	BK 3	MW	Stabw	Teichlevel	LK 1	LK 2	LK3	MW	Stabw
				D-90 Wert						D-90 Wert	
Wasser	4,00	2,21		3,11	1,27	Wasser	4,50	4,03		4,27	0,33
Sed.-Oberfl.	2,47	2,15		2,31	0,23	Sed.-Oberfl.	2,27	2,96		2,62	0,49
Sed.- 3 cm	2,99	7,98		5,49	3,53	Sed.- 3 cm	2,93	7,61		5,27	3,31
pH 12											
Teichlevel	BK 1	BK 2	BK 3	MW	Stabw	Teichlevel	LK 1	LK 2	LK3	MW	Stabw
				D-90 Wert						D-90 Wert	
Wasser	0,29	0,87	0,97	0,71	0,37	Wasser	0,94	0,29	1,47	0,90	0,59
Sed.-Oberfl.	2,02	4,82	0,91	2,58	2,01	Sed.-Oberfl.	0,92	0,92	0,55	0,80	0,21
Sed.- 3 cm	3,45	1,34	2,57	2,45	1,06	Sed.- 3 cm	3,39	1,89	2,50	2,59	0,75

Tabelle A28: Geschätzte Persistenz von HVAV 110 unter Laborbedingungen mit bei pH 12 und 4°C mit Oberflächenwasser/Sediment aus dem Hohenheimer Eiszeitteich (D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine log₁₀-Stufe = 90% der Virusbelastung, MW= Mittelwert, Stabw = Standardabweichung, BK = Branntkalk, LK = Löschkalk)

pH 12											
Teichlevel	BK 1	BK 2	BK 3	MW	Stabw	Teichlevel	LK 1	LK 2	LK3	MW	Stabw
				D-90 Wert						D-90 Wert	
Wasser	0,73	0,52	0,52	0,59	0,12	Wasser	1,06	1,01	1,43	1,16	0,23
Sed.-Oberfl.	0,25	0,60	0,59	0,48	0,20	Sed.-Oberfl.	0,89	1,03	1,09	1,00	0,10
Sed.- 3 cm	1,92	1,99	3,81	2,57	1,07	Sed.- 3 cm	2,74	2,30	2,89	2,64	0,31

Tabelle A29: Geschätzte Persistenz von VHSV 1087 unter Laborbedingungen mit bei pH 11/12 und 4°C mit Oberflächenwasser/Sediment aus einer Aquakulturanlage (D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine log₁₀-Stufe = 90% der Virusbelastung, MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung, BK = Branntkalk, LK = Löschkalk)

pH 11											
Teichlevel	BK 1	BK 2	BK 3	MW	Stabw	Teichlevel	LK 1	LK 2	LK3	MW	Stabw
				D-90 Wert						D-90 Wert	
Wasser	2,81	7,86	6,17	5,61	2,57	Wasser	3,19	22,08	4,37	9,88	10,58
Sed.-Oberfl.	2,04	3,81	2,04	2,63	1,02	Sed.-Oberfl.	1,34	20,33	11,03	10,90	9,50
Sed.- 3 cm	1,22	4,69	11,96	5,96	5,48	Sed.- 3 cm	1,06	22,08	2,33	8,49	11,79
pH 12											
Teichlevel	BK 1	BK 2	BK 3	MW	Stabw	Teichlevel	LK 1	LK 2	LK3	MW	Stabw
				D-90 Wert						D-90 Wert	
Wasser	1,11	1,72	1,26	1,36	0,32	Wasser	0,70	6,74	3,12	3,52	3,04
Sed.-Oberfl.	1,64	0,22	0,59	0,82	0,74	Sed.-Oberfl.	1,08	0,76	4,92	2,25	2,31
Sed.- 3 cm	1,72	7,15	3,49	4,12	2,77	Sed.- 3 cm	0,64	5,69	2,19	2,84	2,59

Tabelle A30: Geschätzte Persistenz von VHSV 1087 unter Laborbedingungen mit bei pH 11/12 und 4°C mit Oberflächenwasser/Sediment aus dem Hohenheimer Eiszeitteich (D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine log₁₀-Stufe = 90% der Virusbelastung, MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung, BK = Branntkalk, LK = Löschkalk)

pH 11											
Teichlevel	BK 1	BK 2	BK 3	MW	Stabw	Teichlevel	LK 1	LK 2	LK3	MW	Stabw
				D-90 Wert						D-90 Wert	
Wasser	2,24	2,09	3,29	2,54	0,65	Wasser	1,93	2,29	2,99	2,40	0,54
Sed.-Oberfl.	1,53	1,71	3,89	2,38	1,31	Sed.-Oberfl.	2,42	2,33	6,36	3,70	2,30
Sed.- 3 cm	2,83	9,17	3,50	5,17	3,48	Sed.- 3 cm	2,93	28,49	4,39	11,94	14,35
pH 12											
Teichlevel	BK 1	BK 2	BK 3	MW	Stabw	Teichlevel	LK 1	LK 2	LK3	MW	Stabw
				D-90 Wert						D-90 Wert	
Wasser	0,75	0,75	3,80	1,77	1,76	Wasser	1,90	0,24	8,53	3,56	4,39
Sed.-Oberfl.	0,90	0,24	0,23	0,46	0,38	Sed.-Oberfl.	1,80	0,24	0,79	0,94	0,79
Sed.- 3 cm	1,82	3,33	15,55	6,90	7,53	Sed.- 3 cm	2,57	6,01	15,55	8,04	6,72

Tabelle A31: Geschätzte Persistenz von VHSV 1087 unter Laborbedingungen mit bei pH 11/12 und 4°C mit Standard - Oberflächenwasser/Sediment (D-90 Wert = theoretisch benötigte Zeit für die Reduktion der Viruskonzentration um eine log₁₀-Stufe = 90% der Virusbelastung, MW= Mittelwert, Stabw = Standardabweichung, BK = Branntkalk)

pH 12					
Teichlevel	BK 1	BK 2	BK 3	MW	Stabw
				D-90 Wert	
Wasser	4,79	0,27		2,53	3,20
Sed.-Oberfl.	1,94	0,27		1,11	1,18
Sed.- 3 cm	1,30	4,51		2,91	2,27

Tabelle A32: Daten Feldversuch 1/ Teiche, Mittelwerte (MW) der Virustiter $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ und Standard-abweichung (Stabw), zur Berechnung der linearen Regression wurde die Nachweisgrenze von $\leq 1,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ gleich Null gesetzt

Teich 1						
Tag	Wasser		Sed.-Oberfl.		Sed. - 3 cm	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
	log₁₀-Wert		log₁₀-Wert		log₁₀-Wert	
0	4,63	0,53	4,63	0,53	4,63	0,53
1	1,88	2,65	0,00	0,00	4,75	0,35
3	2,00	0,35	2,00	0,35	3,50	1,41
5	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	0,00
Lineare Regression	y = -0,7635x + 3,8441		y = -0,6046x + 3,0178		y = 0,0014x + 4,4669	
Bestimmtheitsmaß R²	0,7910		0,3732		R2 = 2E-05	
D-90 in Tagen	1,31		1,65		714,29	
Teich 2						
Tag	Wasser		Sed.-Oberfl.		Sed. - 3 cm	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
	log₁₀-Wert		log₁₀-Wert		log₁₀-Wert	
0	4,63	0,53	4,63	0,53	4,63	0,53
1	3,75	0,71	2,38	0,88	3,50	0,35
3	0,00	0,00	0,88	1,24	1,00	1,41
5	0,00	0,00	0,88	1,24	0,00	0,00
Lineare Regression	y = -1,5907x + 4,9143		y = -0,699x + 3,7627		y = -0,952x + 4,4246	
Bestimmtheitsmaß R²	0,9766		0,7640		0,9654	
D-90 in Tagen	0,63		1,43		1,05	
Teich 3						
Tag	Wasser		Sed.-Oberfl.		Sed. - 3 cm	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
	log₁₀-Wert		log₁₀-Wert		log₁₀-Wert	
0	4,63	0,53	4,63	0,53		
1	0,00	0,00	0,00	0,00		
3	2,50	0,53	2,13	0,53		
5	0,00	0,00	0,00	0,00		
Lineare Regression	y = -0,9089x + 4,8005		y = -0,9188x + 4,7018			
Bestimmtheitsmaß R²	0,9743		0,9954			
D-90 in Tagen	0,25		0,25			

Tabelle A33: Daten Feldversuch 1/ Teiche, D-90 Einzelwerte sowie Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw)

	D-90	D-90	D-90	MW	Stabw
Teichlevel	Teich 1	Teich 2	Teich 3	D-90	D-90
Wasser	1,31	0,63	1,10	1,01	0,35
Sed.-Oberfl.	1,65	1,43	1,00	1,36	0,33
Sed.- 3 cm		1,05		1,05	0,00

Tabelle A34: Daten Feldversuch 2/ Teiche, Mittelwerte (MW) der Virustiter $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ und Standardabweichung (Stabw), zur Berechnung der linearen Regression wurde die Nachweisgrenze von $\leq 1,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ gleich Null gesetzt.

Teich 1						
Tag	Wasser		Sed.-Oberfl.		Sed. - 3 cm	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
	\log_{10} -Wert		\log_{10} -Wert		\log_{10} -Wert	
0	5,13	0,18	5,13	0,18	5,13	0,18
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Lineare Regression	$y = -5,13x + 5,13$		0		$y = -5,13x + 5,13$	
Bestimmtheitsmaß R^2	1,00		1,00		1,00	
D-90 in Tagen	0,19		0,19		0,19	
Teich 2						
Tag	Wasser		Sed.-Oberfl.		Sed. - 3 cm	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
	\log_{10} -Wert		\log_{10} -Wert		\log_{10} -Wert	
0	5,13	0,18	5,13	0,18	5,13	0,18
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Lineare Regression	$y = -5,13x + 5,13$		$y = -5,13x + 5,13$		$y = -5,13x + 5,13$	
Bestimmtheitsmaß R^2	1,00		1,00		1,00	
D-90 in Tagen	0,19		0,19		0,19	

Teich 3						
Tag	Wasser		Sed.-Oberfl.		Sed. - 3 cm	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
	log ₁₀ -Wert		log ₁₀ -Wert		log ₁₀ -Wert	
0	4,00	0,71	4,00	0,71	4,00	0,71
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	1,33	1,15
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,87
Lineare Regression	y = -4x + 4		y = -4x + 4		y = -0,4492x + 2,4689	
Bestimmtheitsmaß R²	1,00		1,00		0,31	
D-90 in Tagen	0,25		0,25		2,23	
Teich 4						
Tag	Wasser		Sed.-Oberfl.		Sed. - 3 cm	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
	log ₁₀ -Wert		log ₁₀ -Wert		log ₁₀ -Wert	
0	4,00	0,71	4,00	0,71	4,00	0,71
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,58	1,01	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58	1,01
Lineare Regression	y = -0,5805x + 2,452		y = -4x + 4		y = -0,5014x + 2,274	
Bestimmtheitsmaß R²	0,45		1,00		0,33	
D-90 in Tagen	1,72		0,25		1,99	

Tabelle A35: Daten Feldversuch 2/ Teiche, D-90 Einzelwerte sowie Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw)

	D-90	D-90	D-90	D-90	MW	Stabw
Teichlevel	Teich 1	Teich 2	Teich 3	Teich 4	D-90	D-90
Wasser	0,19	0,19	0,25	1,72	0,60	0,76
Sed.-Oberfl.	0,19	0,19	0,25	0,25	0,24	0,03
Sed.- 3 cm	0,19	0,19	2,23	1,99	1,66	1,11

Tabelle A36: Daten Feldversuch 2 / Boden, D-90 Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) der Virustiter $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ und Standardabweichung (Stabw), zur Berechnung der linearen Regression wurde die Nachweisgrenze von $\leq 1,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ gleich Null gesetzt

Boden								
	3 cm		5 cm		10 cm		durchmischt 10 cm	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
Tag	\log_{10}-Wert		\log_{10}-Wert		\log_{10}-Wert		\log_{10}-Wert	
0	4,00	0,71	4,00	0,71	4,00	0,71	4,00	0,71
1	0,00	0,00	0,00	0,00	1,25	1,09	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Lineare Regression	$y = -4x + 4$		$y = -4x + 4$		$y = -0,6271x + 3,161$		$y = -4x + 4$	
R²	1,00		1,00		0,69		1,00	
D- 90 in Tagen	0,25		0,25		1,59		0,25	

Tabelle A37: Daten Feldversuch 3 / Teiche, Mittelwerte (MW) der Virustiter $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ und Standardabweichung (Stabw), zur Berechnung der linearen Regression wurde die Nachweisgrenze von $\leq 0,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ gleich Null gesetzt.

Teich 1						
Tag	Wasser		Sed.-Oberfl.		Sed. - 3 cm	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
	log₁₀-Wert		log₁₀-Wert		log₁₀-Wert	
0	3,63	0,88	3,63	0,88	3,63	0,88
1	2,75	0,90	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Lineare Regression	$y = -1,2336x + 3,7714$		$y = -3,63x + 3,63$		$y = -3,63x + 3,63$	
Bestimmtheitsmaß R²	0,99		1,00		1,00	
D-90 in Tagen	0,81		0,28		0,28	
Teich 2						
Tag	Wasser		Sed.-Oberfl.		Sed. - 3 cm	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
	log₁₀-Wert		log₁₀-Wert		log₁₀-Wert	
0	3,63	0,88	3,63	0,88	3,63	0,88
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Lineare Regression	$y = -3,63x + 3,63$		$y = -3,63x + 3,63$		$y = -3,63x + 3,63$	
Bestimmtheitsmaß R²	1,00		1,00		1,00	
D-90 in Tagen	0,28		0,28		0,28	
Teich 3						
Tag	Wasser		Sed.-Oberfl.		Sed. - 3 cm	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
	log₁₀-Wert		log₁₀-Wert		log₁₀-Wert	
0			3,63	0,88	3,63	0,88
1			0,00	0,00	0,00	0,00
3			0,00	0,00	0,00	0,00
5			0,00	0,00	0,00	0,00
Lineare Regression			$y = -3,63x + 3,63$		$y = -3,63x + 3,63$	
Bestimmtheitsmaß R²			1,00		1,00	
D-90 in Tagen			0,28		0,28	

Teich 4						
Tag	Wasser		Sed.-Oberfl.		Sed. - 3 cm	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
	log ₁₀ -Wert		log ₁₀ -Wert		log ₁₀ -Wert	
0			3,63	0,88	3,63	0,88
1			0,00	0,00	0,00	0,00
3			0,00	0,00	0,00	0,00
5			0,00	0,00	0,00	0,00
Lineare Regression			y = -3,63x + 3,63		y = -3,63x + 3,63	
Bestimmtheitsmaß R²			1,00		1,00	
D-90 in Tagen			0,28		0,28	

Tabelle A38: Daten Feldversuch 3 / Teiche, D-90 Einzelwerte sowie Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw)

	D-90	D-90	D-90	D-90	MW	Stabw
Teichlevel	Teich 1	Teich 2	Teich 3	Teich 4	D-90	D-90
Wasser	0,81	0,28			0,81	0,37
Sed.-Oberfl.	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,00
Sed.- 3 cm	0,25	0,28	0,28	0,28	0,27	0,02

Anhang II

Tab. A: Makrozoobenthos Artenlisten

Anlage Art	Berger					Drafehn					Kelp					Kentheim					Vollmer				
	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA
Agapetus laniger/delicatulus	4	1
Agapetus sp.	13	1	1	1	1
Allogamus auricollis	6	4	2	53	68	.	.
Amphinemura sp.	5	1	1	2	177	.	36	.	6	
Ancylus fluviatilis	.	2	.	.	4	206	122	190	13	52	31	15	8	39	74	34	25	32	4	9
Anisoptera gen sp.	10	4	3	.	16	883	474	36	49	275	.	4	3	.	.	.	2	2	3	
Anomalopterygella chauviniana	.	1	4	14	14	1	2	8	
Antocha sp.	1	
Asellus aquaticus	11	.	19	1	
Atherix ibis	1	2	
Athripsodes bilineatus	25	3	12	5	6	
Baetidae gen sp.	.	.	3	7	.	.	.	1	
Baetis alpinus/ lutheri/ melanonyx/vardensis	2	4	3	
Baetis rhodani	58	14	6	93	100	277	34	52	65	364	2	2	
Baetis sp.	30	100	353	13	252	1278	980	344	221	298	16	140	105	.	.
Berdeniella sp.	16	1	.	1	10	2	5	6	1	1	10	1	.	.	2	3	.	1	1	6
Brachyptera risi	1	11
Brachyptera risi/seticornis	2	8	13	10	34	16
Brachyptera sp.	1	1	1	4	7	2	5	1
Brillia modesta	.	.	.	1	766	552	17	.	1	5	1	.	1	19	127	67	22	57
Centropilum luteolum	9	115	152	207	120	3	1	.	.
Ceratopogoninae sp.	1	1	.	17	12	4	9	13	24	.	1	1	.	3	.	1	.	.	1	.	
Chaetopterygini/Stenophylacini auricollis Gruppe	24	16	7	16	11	5	11	18	19
Chaetopterygini/Stenophylacini gen sp.	187	27	77	163	90	1
Chaetopteryx sp.	.	2
Chaetopteryx villosa/fusca	2	.	.	1	1	1	1	.	.	4	.	.	7
Chironomidae gen sp.	570
Chironomini gen sp.	.	14	3	2	2	.	5	.	41	3	2	.	.	.

Cloeon dipterum											1					1									
Anlage	Berger					Drafehn					Kelp					Kentheim					Vollmer				
Art	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA
Clytocerus sp.	1	.	.	.	13	.	.	.	17
Dicranota sp.	5	4	1	6	2	10	10	36	12	28	.	.	.	1
Dinocras cephalotes	.	.	1	5	4	1	.	1	6	4	2	5	1
Dixa puberula	1	.	.
Dixa sp.	2	2	2	.	.	.	2	.	.	1
Drusus annulatus	2	61	84	39	55	3	3	26	23	23	31	1	10	14	26	59
Dugesia gonocephola	1	16	.	.	4	65	8	6	18	14	3	4	2	3	8	.	6	3	22	31
Eccisopteryx dalearlica	.	1
Ecdyonurus helveticus Gruppe	1	1	.	.	1	2	4	.	28	18
Ecdyonurus sp.	6	1	3	.	.	23	12	34	1	15	6	1	3	2
Ecdyonurus venosus Gruppe	.	3	2	1	.	.	.	5	2	2	1	3	5	11	19	31	24
Eiseniella tetraeda	.	.	.	1	.	23	19	46	2	14	1	1	12	.	.
Elmis sp. Ad.	105	18	30	21	.	203	129	109	34	47	1
Elmis sp. Lv.	24	7	12	11	12	36	58	31	51	20	1	.
Eloeophila sp.	9	2	1	1	4	1	4	.
Epeorus assimilis	6	12	4	3	1	2	1	.	2	3	.	2	.	.	1
Ephemera danica	.	.	.	2	.	10	3	11	8	22	438	24	9	108	17	164	485	343	680	418	16
Ephemera sp.	4	1	.	288	21	3	55	27
Ephemerella mucronata	213	64	94	58	76	1000	146	49	196	423	11	4	2	.	4
Erioptera sp.	1
Erpobdella octoculata	2	7	16	.	4
Erpobdella sp.	.	.	.	2	.	.	2	6	1	3	4	.	1
Erpobdella vilnensis	3	3	9	1	2	.	1
Esolus sp. Lv.	24	4
Esolus sp. Ad.	501	94	335	34	105	12	.	1
Galba truncatula	3	6	14	4
Gammarus fossarum	2349	105	197	224	224	2	1	1	.	1	24	22	19	1	10
Gammarus pulex	1
Gammarus sp.	1	6	5	1	1	.
Gerris sp.	4	4	.	.
Glossosoma conformis/boltoni	4	2	3	.	2	3	19	4	2

Glossosoma sp.	1			
Goera pilosa	5	4	4	1	1			
Anlage	Berger					Drafehn					Kelp					Kentheim					Vollmer					
Art	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	
Habroleptoides confusa	30	12	26	9	2	4	9	2	8	7	103	34	24	18	27	9	
Habrophlebia lauta	.	4	3	1	.	.	.	
Habroleptoides/ Paraleptophlebia sp.	10	3	1	.	2	2	1	5	
Halesus digitatus/tesselatus	.	.	.	1	.	.	1	
Haliphus sp. Lv.	.	.	.	1	4	3	3	.	.	2	
Helobdella stagnalis	.	.	.	7	.	.	1	.	2	2	7	62	39	199	330	6	3	5	.	.	.	2	7	1	3	
Heptageniidae gen sp.	5	.	2	6	3	.	.	
Hexatoma sp.	1	
Hydraena sp. Ad.	32	6	4	5	4	1	2	50	69	.	.	
Hydroporinae gen sp. Ad.	6	1	10	5	1	27	23	6	5
Hydropsyche dinarica	29	9	13	1	.	.	1	
Hydropsyche incognita	1	
Hydropsyche instabilis	5	4	6	30	26	1	4	2	1	1	.	1	.	2	1	3	.	
Hydropsyche gen sp.	31	1	5	17	22	
Hydropsyche pellucidula	4	1	11	2	1	
Hydropsyche pellucidula/incognita	.	.	.	3	.	.	2	.	2	
Hydropsyche siltalai	.	.	.	29	8	7	10	5	
Hydropsyche sp.	2	59	7	5	24	18	.	1	2	1	1	
Isoperla sp.	.	5	2	8	8	.	5	.	3	1	
Laccophilus sp. Ad.	5	3	1	.	
Laccophilus sp. Lv.	193	11	18	31	28	46	14	12	3	30	26	9	3	3	15	
Lepidostoma hirtum	4	4	
Leptophlebiidae gen sp.	.	.	.	1	
Leuctra fusca Gruppe	30	3	4	7	4	7	3	1	1	1	7	1	3	1	.	
Leuctra geniculata	495	226	288	117	181	
Leuctra nigra	1	.	2	
Leuctra prima-hippopus-inermis-Gr.	70	18	21	20	20	56	34	22	22	23	.	1	1	2	2	.	.	.	3	16	
Leuctra sp.	2	1	.	.	2	11	.	9	.	3	1	.	.	

Limnephilidae gen sp.	231	15	17	32	.	.	2	.	3	17	3	7	4		
Limnephilini gen sp.	2	.	.	.	2	2	.	.	
Limnius sp. Lv.	199	63	45	159	216	40	32	68	26	40	1		
Limnius volckmari Ad.	12	3	8	1	2	5	104	2	6	.	.	.	1		
Anlage	Berger					Drafehn					Kelp					Kentheim					Vollmer				
Art	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA
Lithax niger	1
Lumbricidae gen sp.	8
Micrasema longulum	65	.	1	2	6	.	3	3	2	.	1	6	4	1	5
Micrasema minimum	5	.	.	.	2	1
Nemoura sp.	.	7	13	8	2	15	6	6	8	.	1
Nemurella pictetii	.	8	19	87	48	19	.	.	.	2	.	3	2	6	3	5	50	26	8	12
Nemuridae gen sp.	2
Nephrotoma sp.	3	16	.	.	.
Odeles marginata Lv.	.	.	.	2	25	27	4	18	50	129	72	81	92	51	39	18	16	59
Odontocerum albicorne	15	.	2	3	2	4	.	6
Oecismus monedula	1	2	1	3	2	1	2	.	5
Oligochaeta gen sp.	.	10	.	13	.	3	4	37	.	59	4
Oreodytes sp. Ad.	2	6	4	24	34	2	2	.	1
Oreodytes sp. Lv.	1	1	.	1	.	.
Orectochilus villosus Lv.	1	.	1
Orthocladiinae gen sp.	1	12	17	248	178	13	26	21	63	25	1	1	
Ostracoda gen sp.	25
Oulimnius sp. Ad.	1	1	3	11	12	24	9	14	20	24	2
Oulimnius sp. Lv.	23	12	15	.	8	1	4	175	28	98
Oulimnius sp.	1	10	.	.
Perla marginata	3
Perla sp.	1
Perlodes sp.	4	4
Perlodidae gen sp.	22	.	3
Philidorea Gruppe	1	.	3	2	2
Philopotamus ludificatus	14	2	.	1
Philopotamus montanus	1	.	112
Pisidium sp.	1	14	.	75	8	55	3	70	35

Platambus maculatus Ad.	4	2	1	.	2		
Plectrocnemia conspersa	.	.	.	1	2	2	1	.	1		
Plectrocnemia geniculata	2	3	7	1	2	1		
Plectrocnemia sp.	1	.	1	1	3		
Polycelis felina	1	43	31	.	18	.	.	1	.	.	84	66	85	78	80
Anlage	Berger					Drafehn					Kelp					Kentheim					Vollmer					
Art	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	
Polycelis sp.	13	42	40	1616	2472	5	7	17	27	22	1	3	1	2	4	.	.	.	3	5	
Polycentropodidae gen sp.	1	.	1	.	.	2	2	3	.	2	
Potamopyrgus antipodarum	2	3	16	.	2	
Polycentropus flavomaculatus	2	4	.	1	1	.	3	
Potamophylax cingulatus/luctuosus/latipennis	8	1	1	2	
Potamophylax rotundipennis	2	11	80	32	45	35	2	.	4	16	
Prodiamesa olivacea	.	13	1	.	.	.	23	4	122	9	1	3	.	1	1	
Protonemura sp.	14	.	.	1	5	3	2	1	1	.	35	28	22	26	
Psychomyia pusilla	1	
Radix balthica	.	.	.	Radix	4	
Rhithrogena sp.	2	2	7	.	.	5	.	10	.	4	191	8	4	49	8	40	18	6	1	3	
Rhithrogena semicolorata Gruppe	5	3	4	26	10	4	38	24	4	1	1	.	1	7	.	5	6	6	
Rhyacophila fasciata	1	
Rhyacophila sensu stricto	3	.	2	1	9	5	.	.	
Rhyacophila sensu stricto Gruppe	3	1	3	10	2	1	36	55	10	5	
Rhyacophila sp.	1	
Rhyacophila tristis/aquitana	2	.	1	1	.	.	1	
Seratella ignita	493	779	330	868	504	6	.	.	1	.	.	.	2	1	
Sericostoma personatum/flavicorne	11	1	1	3	2	2	2	2	.	.	81	52	50	21	156	1206	916	256	887	472	94	25	7	12	32	
Sericostomatidae gen sp.	1	
Setodes viridis	6	5	8	17	4	.	.	1	1	232	428	348	52	84	
Sialis fuliginosa	.	2	
Sialis lutaria	.	.	.	1	1	11	10	6	10	.	.	6	2	1	144	226	94	18	60	
Sialis sp.	2	

Silo pallipes	4	2	.	1	4	3	1	.	.		
Silo piceus	1		
Simulium sp.	132	4	8	74	98	5	10	18	.	9	.	.	.	1		
Simulium vernum Gruppe	8	4	5	.	21	69	26	30	52	
Siphonoperla sp.	4	3	2		
Tabanidae gen sp.	2	1	.	1	2		
Tanypodinae gen sp.	3	21	27	109	44	3	12	4	45	6	.	3		
Anlage	Berger					Drafehn					Kelp					Kentheim					Vollmer				
Art	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA	oh	EvA	EnA	uhvA	uhnA
Tanytarsini gen sp.	2	.	.	9	2	9	8	4	26	16	5	7	.	.	
Tinodes pallidulus	4	4	5	
Tinodes waeneri	1	
Tipula (Platytipula) sp.	
Tipula (Yamatotipula) pruinosa Gruppe	
Tubificidae gen sp.	4	.	.	6	
Turbellaria gen sp.	
Zygoptera gen sp.	

Tab. B: Zusatzuntersuchung Makrozoobenthos

	Berger	Kelp	Kentheim	Vollmer
Anomalopterygella chauviniana	.	6	.	6
Baetidae gen. sp.	129	75	103	5
Chaetopteryx villosa/fusca	24	6	6	30
Chironomidae gen. sp.	46	22	31	194
Chironomini gen. sp.	2	28	.	33
Gammaridae gen. sp.	431	352	1696	1
Hydropsyche siltalai	.	12	.	6
Hydropsyche sp.	.	.	.	12
Limnephilini gen. sp.	.	6	.	.
Lype reducta	.	.	.	1
Odontocerum albicorne	6	.	.	12
Philopotamus ludificatus	6	.	.	.
Philopotamus montanus	.	.	6	.
Prodiamesa olivacea	5	21	.	439
Rhyacophila dorsalis-Gr.	30	30	12	18
Rhyacophila sensu stricto	.	.	54	.
Rhyacophila sensu stricto	.	.	.	18
Rhyacophila tristis	.	.	30	.
Seratella ignita	237	30	.	7
Sericostoma personatum/flavicorne	6	54	6	84
Tanypodinae gen. sp.	11	20	25	213
Tanytarsini gen. sp.	2	21	115	126

Tab. C: Zählung Eintagsfliegenest

Treatment	Anzahl Lebend					Anzahl Immobil					Anzahl Tod					Bemerkungen (markierte Werte)
	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	
Kontrolle (A)	7	7	6	6	5	je 1 geschlüpft
Kontrolle (B)	7	6	6	5	5	1	.	1 gefressen, Reste vorhanden
Kontrolle (C)	7	7	7	7	7
Kontrolle (D)	7	7	7	7	7
Kontrolle (E)	7	6	6	6	6	1 geschlüpft
Kontrolle (F)	7	7	7	7	7
Kontrolle (G)	7	7	7	7	7
Kontrolle (H)	7	7	7	7	7
Kontrolle (I)	7	7	7	6	6	1 geschlüpft
Kontrolle (J)	7	6	6	6	6	1
Halamid 0,5 (A)	7	7	7	5	5	2	.	.
Halamid 0,5 (B)	7	7	7	7	7
Halamid 0,5 (C)	7	7	6	5	5	1	1	.	.
Halamid 1,0 (A)	7	6	6	5	5	1	.	1	.	.
Halamid 1,0 (B)	7	7	7	7	7
Halamid 1,0 (C)	7	7	7	7	7
Halamid 2,5 (A)	7	7	7	6	6	1	.	.
Halamid 2,5 (B)	7	7	7	7	6	1	.
Halamid 2,5 (C)	7	7	7	6	6	1	.	.
Halamid 5,0 (A)	7	7	7	7	6	1	.
Halamid 5,0 (B)	7	7	7	4	4	.	.	1	3	.	.
Halamid 5,0 (C)	7	7	7	7	6	.	.	.	1	1	1	.
Halamid 10,0 (A)	7	7	7	5	0	2	5	.
Halamid 10,0 (B)	7	7	7	6	0	.	.	.	4	1	6	.
Halamid 10,0 (C)	7	7	7	5	1	.	.	1	2	1	.	.	.	2	4	.
Halamid 25,0 (A)	7	7	1	0	0	.	1	1	6	1	.	.
Halamid 25,0 (B)	7	7	1	0	0	6	1	.	.

Halamid 25,0 (C)	7	7	1	0	0	.	.	1	6	1	.	.
	Anzahl Lebend					Anzahl Immobil					Anzahl Tod					Bemerkungen (markierte Werte)
Treatment	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	
Halamid 50,0 (A)	7	6	0	0	0	.	1	1	6	.	.	.
Halamid 50,0 (B)	7	7	0	0	0	7	.	.	.
Halamid 50,0 (C)	7	6	0	0	0	.	5	1	6	.	.	.
CaO 8,0 (A)	8	8	7	6	5	2	.	.	1	1	.	1 geschlüpft
CaO 8,0 (B)	7	5	5	4	4	1	.	.	.	1 getötet + 1 tot(Tag 1), 1 geschlüpft (Tag 3)
CaO 8,0 (C)	7	7	7	7	7
CaO 8,5 (A)	7	7	6	6	5	1	1 geschlüpft
CaO 8,5 (B)	8	7	7	5	5	1	.	2	.	.
CaO 8,5 (C)	7	7	7	7	6	1	1	.
CaO 9,0 (A)	7	7	7	6	6	1	.	.
CaO 9,0 (B)	7	7	7	7	6	1	.
CaO 9,0 (C)	8	8	7	6	6	1	.	.	1	1	.	.
CaO 9,5 (A)	7	7	6	6	6	1 geschlüpft
CaO 9,5 (B)	7	6	6	6	6	1 geschlüpft
CaO 9,5 (C)	7	7	7	7	6	1	.
CaO 10,0 (A)	7	6	6	6	6	1 geschlüpft
CaO 10,0 (B)	7	7	7	7	7
CaO 10,0 (C)	7	7	7	7	7
CaO 10,5 (A)	7	0	0	0	0	7
CaO 10,5 (B)	7	0	0	0	0	7
CaO 10,5 (C)	7	0	0	0	0	7

Tab. D: pH-Werte und O₂-Messungen des Eintagsfliegenstestes

Treatment	pH					O ₂ [mg/L]	
	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 1	Tag 4 (Testende)
Kontrolle (A)	7,43	7,41	7,69	7,69	7,83	.	9
Kontrolle (B)	7,47	7,43	7,69	7,7	7,85	.	9,1
Kontrolle (C)	7,47	7,45	7,66	7,73	7,85	.	9,1
Kontrolle (D)	7,46	7,45	7,66	7,81	7,85	.	9,2
Kontrolle (E)	7,45	7,37	7,68	7,77	7,84	.	9,2
Kontrolle (F)	7,45	7,37	7,69	7,74	7,84	.	9,4
Kontrolle (G)	7,45	7,39	7,69	7,7	7,82	.	9,3
Kontrolle (H)	7,45	7,42	7,7	7,76	7,81	.	9,4
Kontrolle (I)	7,46	7,48	7,71	7,78	7,8	.	10
Kontrolle (J)	7,46	7,51	7,73	7,81	7,79	.	9,4
Halamid 0,5 (A)	7,88	.	.	.	7,75	.	9,4
Halamid 0,5 (B)	7,86	.	.	.	7,76	.	9,3
Halamid 0,5 (C)	7,81	.	.	.	7,77	.	9,4
Halamid 1,0 (A)	7,79	.	.	.	7,81	.	9,5
Halamid 1,0 (B)	7,75	.	.	.	7,78	.	9,5
Halamid 1,0 (C)	7,74	.	.	.	7,78	.	9,5
Halamid 2,5 (A)	7,72	.	.	.	7,76	.	9,7
Halamid 2,5 (B)	7,69	.	.	.	7,74	.	9,5
Halamid 2,5 (C)	7,69	.	.	.	7,73	.	9,9
Halamid 5,0 (A)	7,73	.	.	.	7,74	.	9,6
Halamid 5,0 (B)	7,71	.	.	.	7,74	.	9,6
Halamid 5,0 (C)	7,68	.	.	.	7,73	.	9,6
Halamid 10,0 (A)	7,67	.	.	.	7,73	.	9,8
Halamid 10,0 (B)	7,65	.	.	.	7,75	.	10
Halamid 10,0 (C)	7,64	.	.	.	7,75	.	10,2
Halamid 25,0 (A)	7,64	.	.	7,78	.	.	13,1
Halamid 25,0 (B)	7,63	.	.	7,77	.	.	13
Halamid 25,0 (C)	7,63	.	.	7,79	.	.	13
Halamid 50,0 (A)	7,62	.	7,58	.	.	.	10,8
Halamid 50,0 (B)	7,6	.	7,6	.	.	.	10,6
Halamid 50,0 (C)	7,6	.	7,61	.	.	.	10,6
CaO 8,0 (A)	7,56	7,66	7,8	7,75	7,74	.	9,8
CaO 8,0 (B)	7,59	7,68	7,8	7,76	7,73	.	9,8
CaO 8,0 (C)	7,6	7,7	7,8	7,76	7,72	.	9,8
CaO 8,5 (A)	7,7	7,69	7,76	7,75	7,64	.	9,5
CaO 8,5 (B)	7,61	7,65	7,71	7,73	7,64	.	10,1
CaO 8,5 (C)	7,61	7,65	7,68	7,74	7,65	.	10,1
CaO 9,0 (A)	8,34	7,69	7,68	7,73	7,68	.	10,2
CaO 9,0 (B)	8,41	7,73	7,7	7,75	7,73	.	10,3
CaO 9,0 (C)	8,66	7,77	7,71	7,72	7,75	.	9,9
CaO 9,5 (A)	8,72	7,8	7,6	7,75	7,82	.	10,4
CaO 9,5 (B)	8,52	7,8	7,6	7,72	7,86	.	10,5
CaO 9,5 (C)	8,59	7,81	7,61	7,82	7,88	.	10,7

Treatment	pH					O ₂ [mg/L]	
	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 1	Tag 4 (Testende)
CaO 10,0 (A)	8,67	7,8	7,67	7,83	7,9	.	10,7
CaO 10,0 (B)	8,84	7,77	7,7	7,83	7,85	.	10,8
CaO 10,0 (C)	8,93	7,74	7,7	7,84	7,8	.	10,1
CaO 10,5 (A)	10,11	7,7				12,5	
CaO 10,5 (B)	10,19	7,67				12,6	
CaO 10,5 (C)	10,23	7,62				12,5	

Tab. E: Physikalisch-chemische Messungen an der Teichanlage Drafehn

	oh	E_vA	E_nA	uh_vA	uh_nA
Probenahmedatum	05.06.2012	21.05.2012	04.06.2012	21.05.2012	04.06.2012
pH	8,8	9,4	10,1	8,5	9,15
Leitfähigkeit [μS/cm]	165	164	178	202	177
Temperatur [$^{\circ}$C]	12,4	15,6	13,5	20,7	16,3
Sauerstoffgehalt [mg/l]	x	8,8	10,4	7,9	9,4
Strömung [m/s]	0,28-0,58	0,03-0,26	0,09-0,73	0,25-0,55	0,15-0,55

Tab. F: Physikalisch-chemische Messungen an der Teichanlage Berger

	oh	E_vA	E_nA	uh1_vA	uh1_nA	uh2_vA	uh2_nA
Probenahmedatum	17.04.12	16.04.13	17.04.13	16.04.13	17.04.13	16.04.13	17.04.13
pH	7,3	6,6	7,6	6,3	7,2	6,6	7,5
Leitfähigkeit [μS/cm]	113	137	.	138	.	139	.
Temperatur [$^{\circ}$C]	5,2	6,1	.	6,9	.	6,5	.
Sauerstoffgehalt [mg/l]	14,4	14,6	.	14,4	.	14,3	.
Strömung [m/s]	0,2-1	0,01-0,15	.	0,2-1,4	.	0,04-0,32	.

Tab. G: pH während des Ablassens an der Teichanlage Berger

Uhrzeit	E_während	uh 1	uh 2	oberhalb Einlauf
09:30	Beginn Ablassen			
09:50	10.95	7.26	7.24	.
10:30	10.72	8.91	8.35	.
11:50	10.35	8.84	8.74	.
13:00	10.37	9.02	8.77	.
14:30	Ende Ablassen			
14:40	8.25	8.79	8.78	.
14:50	7.8	.	.	7.47
14:55	7.61	.	.	.
15:10	7.57	8.03	8.31	.
16:30	.	7.23	7.54	.

Tab. H: Physikalisch-chemische Parameter an der Teichanlage Vollmer

	oh	E_vA	E_nA	uh_vA	uh_nA
Probenahmedatum	28.08.12	28.08.12	29.08.12	28.08.12	29.08.12
pH	8.14	7.80	9.50	7.85	8.19
Leitfähigkeit [µS/cm]	142	1184	690	1185	10
Temperatur [°C]	12.4	15.1	15.0	14.7	15.7
Sauerstoffgehalt [mg/l]	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Strömung [m/s]	0,02-0,21	0,03-0,16	keine Änderung	0,03-0,34	keine Änderung

Tab. I: pH während des Ablassens an der Teichanlage Vollmer

Datum	Uhrzeit	E_vA	E_während
28.08.12	18:15	8.06	.
28.08.13	20:15	Beginn Ablassen	
29.08.12	09:15	.	10,84
29.08.13	09:15	Bretter werden vollständig gezogen	
29.08.14	09:30	.	10.27
29.08.15	09:40	.	10.0
29.08.16	09:45	.	9.7
29.08.17	09:50	.	7.9
29.08.18	10:45	Ende Ablassen	

Tab. J: Physikalisch-chemische Parameter an der Teichanlage Kelp

	oh	E_vA	E_nA	uh_vA	uh_nA
Probenahmedatum	28.08.12	27.08.12	30.08.12	27.08.12	30.08.12
pH	8,07	8,06	8,22	7,94	7,96
Leitfähigkeit [µS/cm]	471	381	935	461	933
Temperatur [°C]	14,2	16,5	14,3	15,1	14,1
Sauerstoffgehalt [mg/l]	k.A.	9,4	k.A.	k.A.	k.A.
Strömung [m/s]	0,03-014	0,02-0,43	0,01-0,52	0,05-0,48	0,03-0,32

Tab. K: pH während des Ablassens an der Teichanlage Kelp

Datum	Uhrzeit	E_während
28.08.12	10:15	8,2
	10:30	Beginn Ablassen
	12:00	10,62
	12:00	11,06
	13:15	10,09
	13:45	10,16
	13:50	10,8
	16:00-16.30	Pause wegen Umpumpen von Frischwasser
	16:30	10,89
	17:00-21:00	Pause
	21:00	10,0
	21:30	11,3
	21:31	10,7
	21:40	10,1
28.08./29.08.12	21:40-10.20	Ablassen über Nacht durch Lücken der Bretter
29.08.12	10:15	9,3
	10:21	Bretter gezogen
	10:22	10,2
	10:25	10,3
	12:30	9,62
	12:40	10,4
	12:45	8,16
	18:10	9,68
	18:15	9,74
	18:20	10,08
	18:25	10,34
	18:30	10,35
	20:30	Pause
30.08.12	09:00	8,4
	09:00	Brett wird gezogen
	09:00	9,6
	11:00	9,78
	11:00	10,1
	11:00	9,73
	11:15	9,8
	11:15	Ende des Versuchs

Tab. L: Phsikalisch-chemische Parameter an der Teichanlage Kentheim

	oh	E_vA	E_nA	uh_vA	uh_nA
Probenahmedatum	09.03.12	08.03.12	09.03.12	08.03.12	09.03.12
pH	7.40	8.24	7.74	8.20	8.30
Leitfähigkeit [μS/cm]	233.00	224.00	227.00	233.00	227.00
Temperatur [$^{\circ}$C]	2.30	5.30	4.50	5.30	5.50
Sauerstoffgehalt [mg/l]	14.40	15.10	13.10	15.40	12.70
Strömung [m/s]	0,01-0,7	0,1-0,9	k.A.	0,05-0,5	0,05-0,5

Tab. M: pH während des Ablassens

Uhrzeit	E_während
k.A.	9.20
k.A.	8.99
k.A.	7.92
k.A.	7.95