

## Maßnahmen gegen Virose in der ökologischen Aquakultur

Measures against viroses in organic aquaculture

**FKZ: 10OE053**

**Projektnehmer:**

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei

Weilheimer Str. 8, 82319 Starnberg

Tel.: +49 9193 50890-12

Fax: +49 9193 4414

E-Mail: Hoechstadt@LfL.bayern.de

Internet: www.lfl.bayern.de

**Autoren:**

Mletzko, Adam; Oberle, Martin; Christian, Jürgen

**Herausgeberin:**

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)

Referat 512

Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft

- Forschungsmanagement -

Deichmanns Aue 29

53179 Bonn

Tel.: +49 228 99 6845-3287 (Zentrale)

Fax: +49 228 6845-2907

E-Mail: boeln-forschung@ble.de

Internet: www.bundesprogramm.de

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Dieses Dokument steht unter [www.orgprints.org/32559](http://www.orgprints.org/32559) zum Herunterladen zur Verfügung.

# Maßnahmen gegen Virose in der ökologischen Aquakultur

## Schlussbericht

---

Zuwendungsempfänger:

**Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft**

**Institut für Fischerei**

**Weilheimer Str. 8**

**82319 Starnberg**

---

### **Zusammenarbeit mit anderen Stellen:**

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Dr. Jürgen Christian)

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik  
(Prof. Dr. Rainer Buchholz, Dr. Anna Becker, Anette Amtmann)

Tierärztliche Hochschule Hannover, Arbeitsgruppe Fischkrankheiten und Fischhaltung  
(Prof. Dr. D. Steinhagen, Dr. Mikolaj Adamek)

Gefördert mit Mitteln des Bundesprogramms

Ökologischer Landbau

**BÖLN**

---

Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
und andere Formen nachhaltiger  
Landwirtschaft

**Laufzeit des Vorhabens**

**01.11.2010 – 31.12.2014**

**FKZ: 2810OE053**

---

---

**Autoren:** Dipl.-Ing. Adam Mletzko (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg,, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, BVT)  
Dr. Martin Oberle (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, LfL)  
Dr. Jürgen Christian (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, LGL)

**Kontaktperson:** Dr. Martin Oberle  
Leiter der Außenstelle für Karpfenteichwirtschaft, Institut für Fischerei,  
Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft  
Greiendorfer Weg 8, 91315 Höchstadt  
[martin.oberle@lfl.bayern.de](mailto:martin.oberle@lfl.bayern.de)

Mletzko, A.; Oberle, M.; Christian, J; Becker, A.; Amtmann, A.; Steinke, K.; Steinhagen, D.; Wedekind, H.; Buchholz, R.

## Summary

Within the project the influence of different disinfection strategies for dealing with ecological fish farms after outbreaks of diseases caused by koi herpesvirus (KHV) and viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) should be investigated. Due to the fact that sediments have been believed to act as virus reservoirs, the main focus was directed to the virus adsorbed on them.

In order to achieve this goal, sufficient virus concentrations had to be provided allowing appropriate realization and documentation of disinfection experiments. Up to the date, no such titers had been reported for KHV. Consequently, an optimization of the *in vitro* KHV replication was the basic requirement. For evaluation of the infection, dilution techniques had to be established in order to provide reliable quantification of infective particles. As a result, experiments of virus adsorption onto selected materials and the influence of ecological disinfectants in solution as well as on adsorbed virus could be accomplished.

By means of optimization of the virus-host system, titers of KHV, such as  $1 \times 10^8$  plaque-forming units (PFU) per mL, could be reached, enabling inactivation studies on both viruses. At first, minimal concentrations of burnt lime and peracetic acid resulting in a complete inactivation of both viruses in suspension could be determined as 10 mmol/L and 0.1 vol.-%, respectively. The shifting of the pH-level of the solution down to 4.5 and up to 12 also showed to be very effective. The analyses of 87 ponds show a pH-level of the soil in a range of 4,8 to 7,8. In the case of very low pH-level no disinfection will be needed respectively the disinfection with peracetic acid is preferable to the application of lime. Additionally, a protease (Neutrase®) was considered as a promising disinfectant with concentrations of 8 U/L leading to complete inactivation of  $1 \times 10^6$  PFU/mL of virus. Finally, established germicides were also successfully applied to adsorbed viruses on solid material.

The investigation of virus stability leads to the presumption that a combination of factors, such as light, temperature and especially proteases produced by microorganisms in natural ponds, are sufficient to inactivate viruses in water as well as in sediments. Consequently, it is most important to make sure, that no further reservoirs such as latent hosts or other known carriers stay behind after having removed diseased fish. Because of resistivity against freeze-thawing cycles of both viruses and considerably decelerated disinfection processes at cool temperatures, all strategies should take place during summer.

## Kurzfassung

Im Projekt sollten verschiedene Strategien der Desinfektion von Teichböden untersucht werden, die nach einem Ausbruch der Krankheiten Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) und Koi Herpesvirus-Infektion (KHV-I) die verantwortlichen Viren KHV und VHSV zuverlässig inaktivieren. Besonderes Augenmerk sollte auf an Sedimenten gebundenes Virus gelegt werden, da vermutet wird, dass Sedimente als Reservoir für Viren dienen können.

Um dieses Ziel zu erreichen, mussten zuerst ausreichende Viruskonzentrationen hergestellt werden, um die Desinfektionsversuche durchführen und adäquat dokumentieren zu können. Da bis zu diesem Zeitpunkt, im Fall des KHV, keine so hohen Titer gezeigt werden konnten, stellte die Verbesserung der *in vitro* KHV-Replikation eine Grundvoraussetzung dar. Mittels verfahrenstechnischer Optimierung des Virus-Wirt-Systems konnte der

Titer des KHV weit über die benötigte Infektiosität auf  $1 \times 10^8$  *plaque-forming units* (PFU) per mL erhöht werden, das Inaktivierungsversuche für beide Viren ermöglichte.

Die zunächst in der Suspension bestimmte minimale Konzentrationen von Branntkalk und Peressigsäure, die zu einer vollständigen Inaktivierung der beiden Viren führte, wurden respektive als 10 mmol/L und 0,1 vol.-% identifiziert. Eine Änderung des pH-Wertes der Lösung auf unter 4,5 oder über 12 ist ebenso effektiv. Untersuchungen von 87 Teichböden zeigen eine Bandbreite des pH-Wertes des Bodens von 4,8 – 7,8 auf. Auf sehr sauren Teichböden ist daher keine Desinfektion mehr erforderlich bzw. ist die Desinfektion mittels Peressigsäure anstelle des Einsatzes von Branntkalk zu erwägen. Zusätzlich wurde eine Protease (Neutrase®) zur Virusdesinfektion getestet und die benötigte Konzentration als 8 U/L ermittelt. Einflüsse der Temperatur auf die Stabilität decken sich mit Literaturangaben, wonach das VHSV ab 28°C innerhalb 24 Stunden und das KHV ab 35°C inaktiviert werden. Schließlich konnten diese Desinfektionsmethoden auch mit adsorbierten Viren bestätigt werden.

Die hier ermittelten Viren-Stabilitätsdaten deuten darauf hin, dass eine Kombination aus allen natürlichen Faktoren, die in Teichen nach der Entfernung des erkrankten Fischbesatzes und dem Ablassen vorhanden sind (pH-Wert, Temperaturänderungen, Proteasen produzierende Mikroflora), zur Inaktivierung der Viruspartikel ausreichen sollten. Da beide Viren gegenüber Gefrierzyklen stabil sind und alle Inaktivierungsprozesse bei niedrigen Temperaturen langsamer erfolgen, wird nach einem Infektionsausbruch das zeitweise Trockenlegen eines Teiches bei höheren Temperaturen empfohlen.

---

---

# Inhaltsverzeichnis

Seite

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Stand des Wissens.....</b>	<b>15</b>
3.1	Virosen bei Cypriniden und Salmoniden .....	15
3.1.1	Das Koi-Herpesvirus alias Cypriniden-Herpesvirus 3 .....	16
3.1.2	Das Virale Hämorrhagische Septikämie-Virus .....	17
3.2	Optimierung einer Virusreplikation .....	18
3.3	Desinfektionsstudien .....	20
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
4.1	Zellkulturtechnik .....	21
4.1.1	Charakterisierung der <i>Common Carp Brain</i> Zellen .....	21
4.1.2	Charakterisierung der <i>Rainbow Trout Fin</i> Zellen .....	22
4.1.3	Herkunft des verwendeten KHV-TP 30 .....	22
4.1.4	Herkunft des VHSV .....	22
4.2	Analytische Methoden.....	23
4.2.1	Endverdünnungsmethode zur Infektiositätsbestimmung .....	23
4.2.2	Real Time Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von KHV-DNA .....	24
4.2.3	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von VHSV-RNA .....	24
4.3	Optimierung einer Virusinfektion .....	24
4.4	Untersuchung der Qualität bayerischer Teichböden .....	25
4.5	Sorption an ausgewählte Matrices.....	26
4.6	Desinfektionsversuche .....	27
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
5.1	Zellkultur .....	28
5.1.1	Wachstumscharakteristik der CCB-Zelllinie .....	28
5.1.2	Wachstumsverhalten der RTF-Zelllinie .....	29
5.2	Infektionscharakteristik der verwendeten Viren .....	29
5.2.1	Infektionsverlauf des KHV <i>in vitro</i> .....	29
5.2.2	Infektionsverlauf des VHSV <i>in vitro</i> .....	31
5.2.3	Infektionsoptimierung des KHV-TP30 .....	31

---

---

5.3	Beschaffenheit der untersuchten Teichböden .....	33
5.3.1	Zusammensetzung der Teichböden .....	35
5.3.2	Gehalt anorganischer Verbindungen .....	36
5.3.3	Gehalt organischer Verbindungen .....	37
5.3.4	Räumliche Variation der Parameter innerhalb ausgesuchter Teiche.....	37
5.4	Adsorptionsversuche mit Modellmatrices.....	39
5.4.1	Adsorption des KHV an Quarzsand und eine Bodenprobe .....	39
5.4.2	Infektiosität des adsorbierten Virus.....	40
5.5	Stabilität der Virussuspensionen .....	40
5.5.1	Stabilität des Koi-Herpesvirusstocks .....	41
5.5.2	Stabilität des Viralen Hämorrhagischen Septikämie Virusstocks.....	41
5.5.3	Einfluss von pH auf das Virus.....	43
5.6	Einfluss der Desinfektionsmittel auf die Infektiosität .....	44
5.6.1	Einfluss von Peressigsäure auf das Virus .....	44
5.6.2	Einfluss von Wasserstoffperoxid auf das Virus .....	45
5.6.3	Einfluss von Branntkalk auf das Virus .....	45
5.6.4	Einfluss von Protease auf das Virus .....	46
5.7	Desinfektion von adsorbiertem KHV .....	47
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>48</b>
6.1	<i>In vitro</i> Replikation der Viren .....	48
6.1.1	Charakterisierung der RTF-Zellen zur Produktion von VHSV .....	48
6.1.2	Charakterisierung der CCB-Zellen zur Produktion von KHV .....	48
6.1.3	Infektionsoptimierung des KHV-TP30 .....	49
6.2	Beschaffenheit der untersuchten Teichböden .....	50
6.3	Adsorptionsversuche mit KHV .....	55
6.4	Stabilität gegenüber äußerer Einflüsse .....	55
6.5	Inaktivierung des Virus mit zugelassenen Desinfektionsmitteln .....	57
<b>7</b>	<b>Anwendung der Ergebnisse für die Praxis und Beratung.....</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>61</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>66</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>67</b>

---

---

## Abkürzungsverzeichnis

BVT	Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik
CCB	<i>Common carp brain</i> (Zelllinie)
CPE	Cytopathischer Effekt
DMEM	<i>Dulbecco's modified essential medium</i> (Zellkulturmedium)
d.p.i	<i>Days post infection</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMEM	<i>Eagles's minimal essential medium</i> (Zellkulturmedium)
EPC	<i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (Zelllinie)
FHM	<i>Fathead minnow</i> (Zelllinie)
FKS	Fötale Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>R</sub>	Reinstwasser (>18 MΩcm)
IPN	Infektiöse Pankreasnekrose
kbp	Kilo-Basenpaare
KHV	Koi Herpesvirus
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
M	Abkürzung für mol/L
MEM	<i>Minimal essential medium</i> (Zellkulturmedium)
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
NEAA	<i>Non essential amino acids</i>
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaOH	Natronlauge
PES	Peressigsäure
PFU	<i>Plug forming units</i>
qPCR	<i>Quantitative (real time) polymerase chain reaction</i>
RTF	<i>Rainbow trout fin</i> (Zelllinie)
RTG-2	<i>Rainbow trout gonad</i> (Zelllinie)
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase chain reaction</i>
T	Tonanteil
TCID <sub>50</sub>	<i>50% Tissue culture infective dose</i>
TiHo	Tierärztliche Hochschule Hannover
TOH	<i>Time of harvest</i>
TOI	<i>Time of infection</i>
VHSV	Virale hämorrhagische Septikämie Virus



---

---

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Arbeitsplan .....	14
Abbildung 2: Erfasste Ausbrüche von KHV in Deutschland und die Jahresproduktion von Karpfen in Deutschland (nach Tiergesundheitsjahresbericht des FLI) .....	15
Abbildung 3: Erfasste Ausbrüche von VHSV und die Jahresproduktion von Salmoniden in Deutschland (nach Tiergesundheitsjahresbericht des FLI) .....	16
Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der Abhängigkeit des Virustiters vom MOI (nach Aggarwal et al. 2011 ) .....	19
Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung zur Abhängigkeit des Virustiters vom TOI (nach Aggarwal et al. 2011 ) .....	19
Abbildung 6: Aufnahmen von CCB-Zellen, zur automatisierten Zählung mit Höchst 33342.....	21
Abbildung 7: Lage der untersuchten Teiche .....	25
Abbildung 8: Wachstumskurve der CCB-Zellen in MEM bei 25°C und 5 % CO <sub>2</sub> .....	28
Abbildung 9: Wachstumskurve der RTF-Zellen in DMEM bei 20°C .....	29
Abbildung 10: Infektionsverlauf des KHV-TP30 in CCB-Zellen.....	30
Abbildung 11: Quantitativer Infektionsverlauf von KHV-TP30 in vitro.....	30
Abbildung 12: Infektionsverlauf von VHSV in RTF-Zellen in DMEM bei 20°C.....	31
Abbildung 13: Einfluss des MOI auf den zeitlichen Verlauf der Infektiosität von KHV bei einem TOI von 60.000 Zellen/cm <sup>2</sup> in MEM bei 25°C.....	32
Abbildung 14: Einfluss der Zellzahl (TOI) auf den zeitlichen Verlauf der Infektiosität von KHV in MEM bei 25°C .....	33
Abbildung 15: Beladung von KHV an Boden- sowie Quarzsandproben bestimmt durch die Endverdünnungsmethode .....	39
Abbildung 16: Waschschritte zur Desorptionsuntersuchung von KHV in DMEM bei 25°C aus 100 mg Bodenproben.....	40
Abbildung 17: Stabilität von KHV-TP30 unter Temperatur- und Medienvariation .....	41
Abbildung 18: Stabilität von VHSV in DMEM bei 8°C und 20°C .....	42
Abbildung 19: Einfluss von Gefrier- und Auftauzyklen bei -80°C auf die Infektiosität einer VHS-Virussuspension.....	42
Abbildung 20: Einfluss des pH-Werts auf die Stabilität des KHV-TP 30 und des VHSV in Medium bei 8°C und einer Verweilzeit von 24 h.....	43
Abbildung 21: Desinfektion von KHV-TP30 und VHSV in DMEM mit Peressigsäure nach 24 h bei 8°C .....	44
Abbildung 22: Desinfektion von KHV-TP30 und VHSV in DMEM mit Wasserstoffperoxid nach 24 h bei 8°C .....	45

---

---

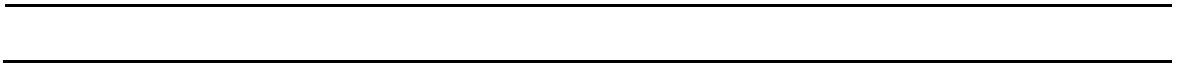
Abbildung 23: Desinfektion von KHV-TP30 in DMEM mit Neutrase® nach 24 h bei 8°C.....	46
Abbildung 24: Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor in mg/100 g.....	51
Abbildung 25: Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> CAL) von Teichböden in Abhängigkeit von der Lage in einer Teichkette .....	52
Abbildung 26: Lage der Entnahmeorte auf unterschiedlichem geologischem Ausgangsgestein.....	53
Abbildung 27: Abhängigkeit zwischen Tongehalt und Kationenaustauschkapazität der untersuchten Teiche .....	54
Abbildung 28: Gemessene pH-Werte in den untersuchten Teichen .....	56
Abbildung 29: Beladung von KHV an Boden- sowie Quarzsandproben bestimmt mittels qPCR nach Gilad et al. (2004).....	69
Abbildung 30: Legende zu Abbildung 26 .....	70

---

---

## Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Arbeitsschritte im Arbeitsplan (Abbildung 1).....	14
Tabelle 2: Literaturübersicht bisher erreichter Titer des KHV aus Zellkulturen .....	17
Tabelle 3: Dauer seit der letzten Entlandung in Jahren.....	34
Tabelle 4: Mittlere Schlammdicke der untersuchten Teiche in cm.....	34
Tabelle 5: Kationenaustauschkapazität von Teichböden aus verschiedenen Regionen Bayerns in mmolc/kg .....	34
Tabelle 6: pH-Werte von Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns .....	35
Tabelle 7: Tongehalt der Teichböden in Massenprozent .....	35
Tabelle 8: Schluffgehalt der Teichböden in Massenprozent .....	35
Tabelle 9: Sandgehalt der Teichböden in Massenprozent.....	36
Tabelle 10: Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> CAL) in mg/100 g Boden .....	36
Tabelle 11: Gehalt an Gesamtphosphor (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) in mg/100 g Boden.....	37
Tabelle 12: Gehalt an Organischer Substanz von Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns (% der T).....	37
Tabelle 13: pH-Wert, Humusgehalt (% der T), Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> CAL, mg/100 g Boden trocken) und Kationenaustauschkapazität (mmolc/kg) in der Schlammauflage sowie im Unterboden von Teichen in verschiedenen Teichregionen .....	38
Tabelle 14: Ton- (T), Schluff- (U) und Sandanteile (S) in der Schlammauflage sowie im Unterboden von Teichen der verschiedenen Regionen .....	38
Tabelle 15: Einfluss der Pufferkapazität der verwendeten Medien auf den pH-Wert von Branntkalk Lösungen .....	46
Tabelle 16: Desinfektion von an Quarzsand adsorbiertem KHV .....	47
Tabelle 17: Gehalt an Ammonium-N (mg/100 g Boden trocken) in Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns* .....	67
Tabelle 18: Gehalt an Nitrat-N (mg/100 g Boden trocken) in Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns .....	67
Tabelle 19: Gehalt an Calcium (mg/100 g Boden trocken) in Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns .....	67
Tabelle 20: Gehalt an Magnesium (mg/100 g Boden trocken) in Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns .....	68
Tabelle 21: Gehalt an Kalium (mg/100 g Boden trocken) in Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns .....	68
Tabelle 22: Gehalt an Natrium (mg/100 g Boden trocken) in Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns .....	68





## 1 Einleitung

Virosen führten bereits im vergangenen Jahrhundert durch ihre Ausbreitung in der sich rasch entwickelnden Aquakultur zu großen Einbußen. Bei der Erzeugung von Forellen verursachten beispielsweise die Virale hämorrhagische Septikämie (VHS) und beim Karpfen die Frühlingsvirämie (SVC) große Ausfälle. Seit den ersten seuchenhaften Ausbrüchen des KHV Ende der 1990-er Jahre in Israel, Deutschland und den USA hat sich diese bis dahin unbekannte Virose weltweit verbreitet. Auch in einigen Regionen Deutschlands gab es durch die KHV-Infektion große Verluste. Bezüglich der Bekämpfung der Seuche gibt es noch viele offene Fragen. Bezüglich der Desinfektion nach einem Seuchenausbruch wurden noch keine einheitlichen Vorgaben in Deutschland festgelegt. Die Frage nach der Desinfektion von Teichböden stellt aufgrund der Komplexität des Lebensraumes, der bisweilen großen Ausdehnung der Flächen und den unterschiedlichen natürlichen Einflussfaktoren eine große Herausforderung dar.

## 2 Zielsetzung

Im Projekt „Maßnahmen gegen Virosen in der ökologischen Aquakultur“, welches gemeinsam mit dem Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, und dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit durchgeführt wurde, ist zentrales Thema die Desinfektion von Teichböden nach einem Ausbruch des Koi-Herpesvirus und des viralen hämorrhagischen Septikämie Virus der Salmoniden. Mit Hilfe von *in vitro* Untersuchungen sollen Aussagen über die Tenazität des Koi Herpesvirus (KHV) und des Viralen Hämorrhagischen Septikämie Virus (VHSV sowie zur Desinfektion von Teichböden getroffen werden.

Ziel des Projektes ist es, den ökologisch wirtschaftenden Teichwirten Empfehlungen für eine sichere Desinfektion von Erdteichen nach einem Ausbruch von KHV oder VHS bereitzustellen. Um dies zu erreichen, sollten gängige Desinfektionsverfahren, die in ökologischen Aquakulturen zugelassen sind detaillierter untersucht werden. Neben dem Einsatz von Branntkalk, der eine lange Tradition besitzt, wurden auch Peressigsäure eingesetzt und erstmals die Effizienz von Proteasen zur Anwendung bei der Desinfektion von Teichböden überprüft. Weiterhin sollen Einflüsse natürlicher Witterungsfaktoren auf die Viren betrachtet werden.

Zur Durchführung der Desinfektionsversuche mussten zuerst die analytischen Methoden etabliert werden, um die Viren nachzuweisen. Neben der amtlich anerkannten Methode des nationalen Referenzlabors, der quantitativen Polymerase Kettenreaktion (qPCR), wurden Endverdünnungsverfahren zur Bestimmung der Infektiosität an Zellkulturen (50 % tissue culture infective dose, TCID<sub>50</sub>) herangezogen. Mit diesen Messverfahren konnten Versuche zur Adsorption an verschiedene Materialien durchgeführt und der Einfluss der zuvor genannten Desinfektionslösungen untersucht werden.

Die bis dahin in der Literatur beschriebenen Replikationsmethoden konnten für das KHV nicht ausreichend hohe Virustiter erreichen, um die geplanten Untersuchungen durchzuführen. Ziel und Voraussetzung für weitere Desinfektionsversuche war die Etablierung einer Methode, mit welcher durch Optimierung des Virus-Wirt-Systems der Titer des KHV deutlich gegenüber bislang bekannten Methoden erhöht werden konnte.

Die Desinfektionsversuche sollten zunächst in Suspension erfolgen, um die gewünschten Konzentrationen bei gewählter Einwirkzeit der Desinfektionsmittel zu bestimmen. Im folgenden wurden Versuche bei an Sedimenten adsorbierten Viren durchgeführt.

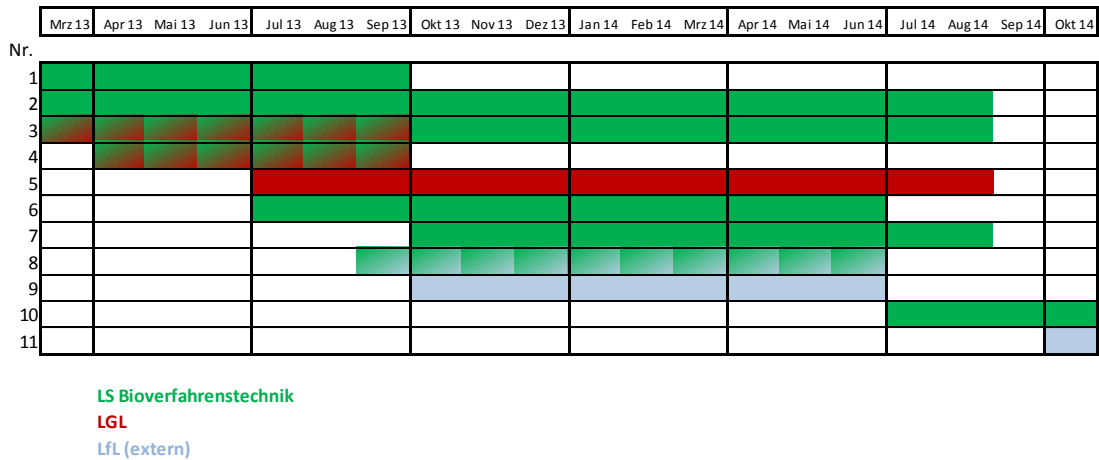


Abbildung 1: Arbeitsplan

Die Arbeitsschritte des Arbeitsplans (Abbildung 1) sind in Tabelle 1 beschrieben.

Tabelle 1: Arbeitsschritte im Arbeitsplan (Abbildung 1)

Arbeitsschritt	Beschreibung der Arbeitsschritte
1	Literaturrecherche zu Virusreplikation, Inaktivierung und Desinfektionsstrategien
2	Methodenetablierung der Zellkulturführung: RT/F und CCB
3	Virusreplikation <i>in vitro</i> : Virus der viralen hämorrhagischen Septikämie und Koi Herpesvirus bereit stellen
4	Nachweismethoden von Virusnukleinsäuren mittels real time Polymerase Kettenreaktion (qPCR): Wissenstransfer zwischen LGL und BVT
5	Messungen der Nukleinsäuren mittels qPCR und RT-PCR am LGL
6	Desinfektionsversuche mit VHS auf Sandboden: Peressigsäure, Branntkalk, Temperatur, Feuchtegehalt
7	Desinfektionsversuche mit KHV, soweit Nachweismethoden verbessert
8	Entnahme von Bodenproben in ausgewählten Teichen
9	Untersuchung der Qualität von Teichböden (Korngröße, Kohlenstoffgehalt, Stickstoff, Phosphat, Kationenaustauschkapazität)
10	Abschlussbericht verfassen
11	Ausarbeitung einer Empfehlung für die praktische Anwendung

### 3 Stand des Wissens

#### 3.1 Virosen bei Cypriniden und Salmoniden

Zu den am häufigsten auftretenden Virosen bei Cypriniden zählt die Frühlingsvirämie der Karpfen (SVC), die bis 2002 als meldepflichtige Krankheit galt. Zusammen mit der Koi Herpesvirus-Infektion (KHV-I) entstehen die größten wirtschaftlichen Einbußen in der Karpfenteichwirtschaft. Bei Ausbrüchen in Deutschland im Jahr 2003 konnten z. B. Mortalitäten von 20 % bis 100 % verzeichnet werden, welche insgesamt Schäden zwischen 300.000 und 400.000 Euro verursachten (Amtliche Methodensammlung 2014). Seit Dezember 2005 gehört die Koi-Herpesvirusinfektion zu den anzeigepflichtigen Krankheiten in Deutschland. Durch das Tiergesundheitsgesetz (TierGesG) sind die Landesbehörden für Veterinärwesen verpflichtet ermittelte Daten und Meldungen an das Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), dem Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, weiter zu geben. Dieses veröffentlicht diese Daten in Form eines online zugänglichen Berichts, dem Tiergesundheitsjahresbericht (Homeier-Bachmann *et al.* 1999 - 2013).

Neben den statistischen Angaben zu Ausbrüchen in den einzelnen Bundesländern und den letzten Jahren (Abbildung 2 und Abbildung 3), lassen sich auch Informationen zur Diagnose und Bekämpfung der Virosen entnehmen.

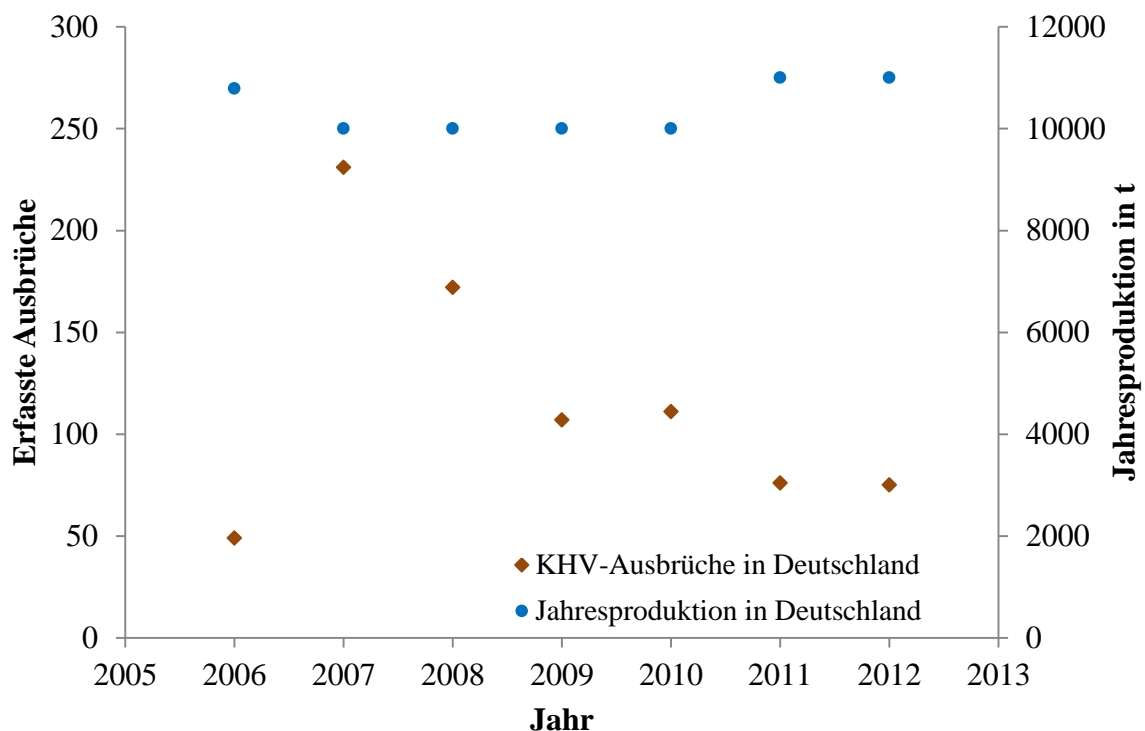


Abbildung 2: Erfasste Ausbrüche von KHV in Deutschland und die Jahresproduktion von Karpfen in Deutschland (nach Tiergesundheitsjahresbericht des FLI)

Das FLI überprüft Methoden zum Nachweis anzeigepflichtiger Tierseuchen und schreibt sie vor. Bei einem auftretenden Verdacht muss eine amtstierärztliche Feststellung des Genoms oder des Erregers durchgeführt werden.

Beim KHV wird dabei routinemäßig die PCR nach Gilad *et al.* 2004 empfohlen. Als weitere Bestätigungsverfahren können neben einer Sequenzanalyse Immunfluoreszenztests oder eine Virusisolierung in Zellkulturen erfolgen.



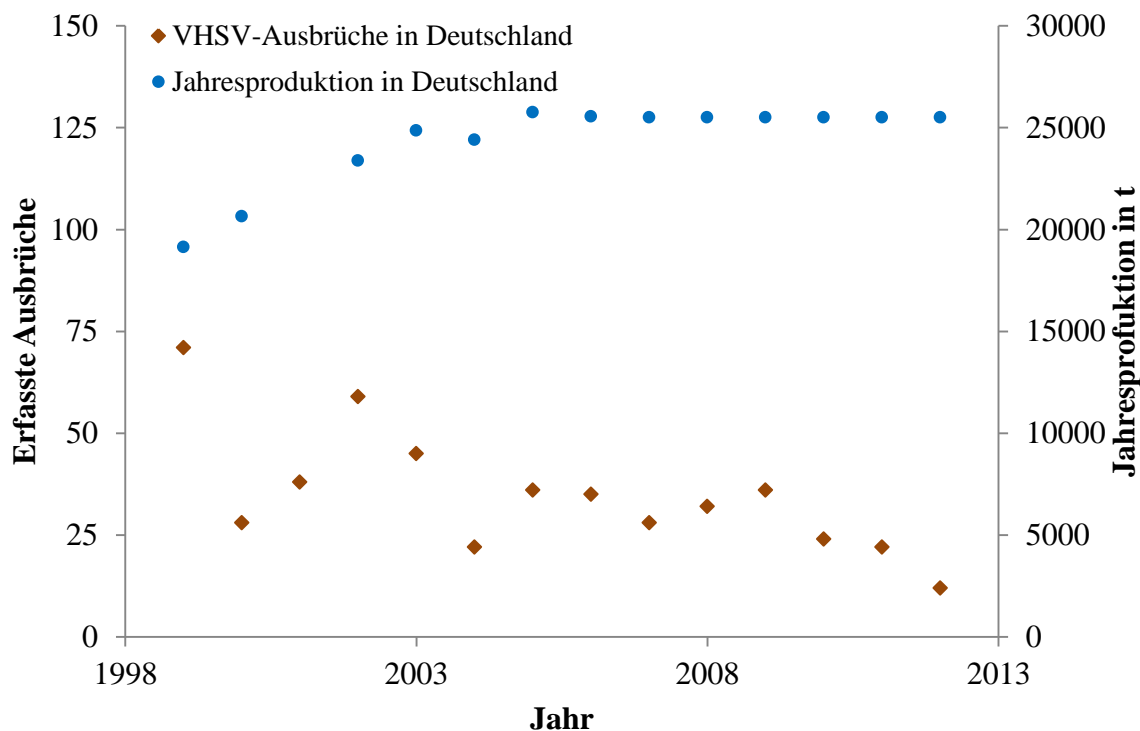


Abbildung 3: Erfasste Ausbrüche von VHSV und die Jahresproduktion von Salmoniden in Deutschland (nach Tiergesundheitsjahresbericht des FLI)

Bei Salmoniden sind vor allem die Infektiöse Pankreasnekrose (IPN), die infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN) und die Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) verantwortlich für Verluste in der Aquakultur aber auch in freien Gewässern. Als anzeigepflichtige Krankheit ist neben der IHN die VHSV die schwerwiegendste der oben genannten mit einer größeren Ausbruchshäufung in den letzten Jahren.

Unter den meldepflichtigen Krankheiten sind derzeit keine Fischviren benannt (Tiergesundheitsjahresbericht 2013).

### 3.1.1 Das Koi-Herpesvirus alias Cypriniden-Herpesvirus 3

Das in Deutschland erstmals 1997 dokumentierte Cypriniden Herpesvirus 3, das anfangs auch als „*Koi immune system suppressing disease*“ bezeichnet wurde und besser unter der Abkürzung KHV bekannt ist, gehört neben der Frühlingsvirämie der Karpfen (SVC) zu den schwerwiegendsten Erkrankungen unter den Cypriniden (Neukirch *et al.* 1999). Seitdem konnten mit diesem Virus hohe ökonomische Verluste weltweit in Zusammenhang gebracht werden, da die Mortalitätsraten bei einem Krankheitsausbruch enorm hoch sind (Perelberg *et al.* 2005). Das Virus gehört der Ordnung der *Herpesvirales* an und besitzt mit 295 kbp das größte Genom in derselben. Es ist folglich ein umhülltes DNA-Virus (Rakus *et al.* 2013).

Unter den bislang isolierten Zellkulturen, die empfänglich für das KHV sind, werden am häufigsten die Linien CCB (Neukirch *et al.* 1999) sowie KF-1 (Hedrick *et al.* 2000) eingesetzt. Insgesamt gab es 1999 bereits 191 isolierte Zelllinien aus Cypriniden. Das KHV konnte aber bislang nur in Zellen repliziert werden, die als Wirt für die Krankheit dienen (Zhou *et al.* 2013). Allen Zellkulturen ist eine eingeschränkte Empfänglichkeit gegenüber aus Fischen isolierten Viren gemeinsam (Bergmann *et al.* 2006). Zudem gibt es keine ein-

heitlichen Replikationsmethoden, die wiederholbar hohe Titer bereit stellen (Tabelle 2). Es sind *in vitro* analytische Methoden etabliert, um das Virus zu identifizieren, wie die Immunfluoreszenzfärbung, diverse PCR-Methoden zum Nachweis von DNA sowie mRNA, als auch ELISA zur Bestimmung von KHV Antikörpern (Bergmann *et al.* 2010, Michel *et al.* 2010, Yuasa *et al.* 2012). Große Herausforderungen stellt bislang weiterhin die Aufarbeitung aus biologischem Material dar. Darunter nicht nur aus latent infizierten Fischen, sondern auch aus Gewässern oder Sedimenten (Eide *et al.* 2011, Honjo *et al.* 2012).

Tabelle 2: Literaturübersicht bisher erreichter Titer des KHV aus Zellkulturen

Max. Virustiter	Zellen	Isolate	Virusernte (TOH)	Referenz
$4 \times 10^4$ PFU/mL	CCB	KHV-I (Ronen <i>et al.</i> 2003)	4 – 7 dpi	Davidovich <i>et al.</i> 2007
$10^5$ PFU/mL	CCB	KHV-U/KHV-I	14 dpi	Eide <i>et al.</i> 2011
$8 \times 10^4$ TCID <sub>50</sub> /mL	CCB	CyHV-3 (Fisch-Isolat 2005)	10 dpi	Rakus <i>et al.</i> 2012
$10^4$ TCID <sub>50</sub> /mL	CCB	CyHV-3 (n.a.)	7-12 dpi	Piackova <i>et al.</i> 2013

\* [PFU/mL] =  $0,69 \times$  [TCID<sub>50</sub>/mL], Poisson-Verteilung, TOH = Time of harvest, I = israelisches Isolat, U = USA-Isolat, n.a. = nicht angegeben

Auch wenn ein Ausbruch der Krankheit bislang nur bei Karpfen und Kois beobachtet werden konnte, weisen aktuelle Veröffentlichungen darauf hin, dass neben dem Karpfen auch alle Karpfenartigen als Wirt in Frage kommen (Davidovich *et al.* 2007). Bei Untersuchung von Organen verwandter Arten konnte wiederholt in einem geringen Anteil bei mit KHV exponierten oder in Kohabitation mit kranken Karpfen gehaltenen Fischen die Nukleinsäure des Virus nachgewiesen werden (Radosavljevic *et al.* 2012).

Ob neben Cypriniden noch weitere Reservoirs des KHV in Teichen vorliegen könnten ist eine der zentralen Fragestellungen bei der Bekämpfung des Virus zum Schutz der Bestände insbesondere in Aquakulturen. Veröffentlichte Untersuchungen beschränken sich dabei meistens auf die Extraktion von Nukleinsäuren aus Sedimenten oder Wasserproben und deren Persistenz (Matsui *et al.* 2008). Die Wiederfindung von KHV-Nukleinsäuren in Sedimenten und Wasserproben suggeriert zumindest ein weiteres Reservoir neben krankheitsübertragenden Tieren in der Umwelt (Honjo *et al.* 2012). Darunter werden Muscheln als Wasserfiltrierer oder weitere Wildfische vermutet (Kielpinski *et al.* 2010).

### 3.1.2 Das Virale Hämorrhagische Septikämie-Virus

Dieses Virus befällt in deutschen Aquakulturen hauptsächlich Forellen, führt jedoch weltweit bei 70 verschiedenen Fischarten zu einer tödlichen Erkrankung (OIE 2009). Es ist ein einsträngiges, negatives RNA-Virus mit einem Genom von etwa 11-12 kbp (Schütze *et al.*, 1995), das sechs Gene von 3' nach 5' codiert. Früher wurde es häufig auch als Egtved-Virus bezeichnet. Je nach geographischer Lage kommt es in verschiedenen Spezies (VHSV I - IV), sowie Subspezies vor, die sich genetisch deutlich voneinander unterscheiden, wodurch die Entwicklung eines universellen PCR-Nachweises erschwert wird (Snow *et al.* 1999). Erst 2011 konnte ein Primerpaar etabliert werden, das in Versuchen alle Varianten des VHSV zuverlässig detektieren lässt (Garver *et al.* 2011).

Im Gegensatz zum KHV lässt sich das VHS-Virus *in vitro* sehr gut replizieren, weshalb hier auch als Methode der Wahl die Vervielfältigung in Zellkulturen mit anschließender Bestätigung durch einen Genom- oder Antikörpernachweis amtlich anerkannt ist (Amtliche Methodensammlung, 2014). Die Vermehrung beschränkt sich auf Temperaturen zwischen 10°C und 22°C. Darüber hinaus weisen Zellen keine Empfänglichkeit gegenüber dem Virus auf. Titer von  $10^9$  PFU/mL lassen sich mit RTG2, EPC aber auch RTF realisieren (Lorenzen *et al.* 1999).

Die Stabilität in der Umwelt wegen des reineren Wassers, in dem Salmoniden gehalten werden, kann mehrere Tage betragen, während das Virus in Karpfenteichwasser, innerhalb von 48 Stunden inaktiviert wird (Licek 2011). Bei pH 12 kann das Virus in weniger als sechs Stunden desinfiziert werden und Temperaturen von 60°C inaktivieren das Virus in weniger als einer Stunde (Dixon *et al.* 2012).

### 3.2 Optimierung einer Virusreplikation

Zur Optimierung von Virusreplikationen werden drei Parameter heran gezogen, die nicht-linear voneinander abhängig sind. Die *Multiplicity of Infection* (MOI) ist der Quotient aus infektiösen Viruspartikeln und vorliegenden lebenden Zellen in der Kultur. Je höher der MOI, desto schneller wird die gesamte Kultur infiziert. Jede Zelle repliziert eine spezifische Viruszahl, bis sie auf Grund des abfallenden energetischen Haushalts lysiert. Wird der MOI zu niedrig gewählt, ist es möglich dass nie alle Zellen infiziert werden, weil sie durch die lange Dauer der Sekundärinfektion eine Nährstofflimitation im Medium erfahren und eine weitere Replikation verhindert wird. Bei zu hohen MOI, kann die maximale Replikation jeder Zelle in Kultur erfolgen, die Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Virusmenge bleibt jedoch gering (Maranga *et al.* 2003). Auf Abbildung 4 ist die Auswirkung unterschiedlicher imaginärer MOI vereinfacht dargestellt. Der grüne Verlauf stellt ein theoretisches Optimum mit hoher Ausbeute dar.

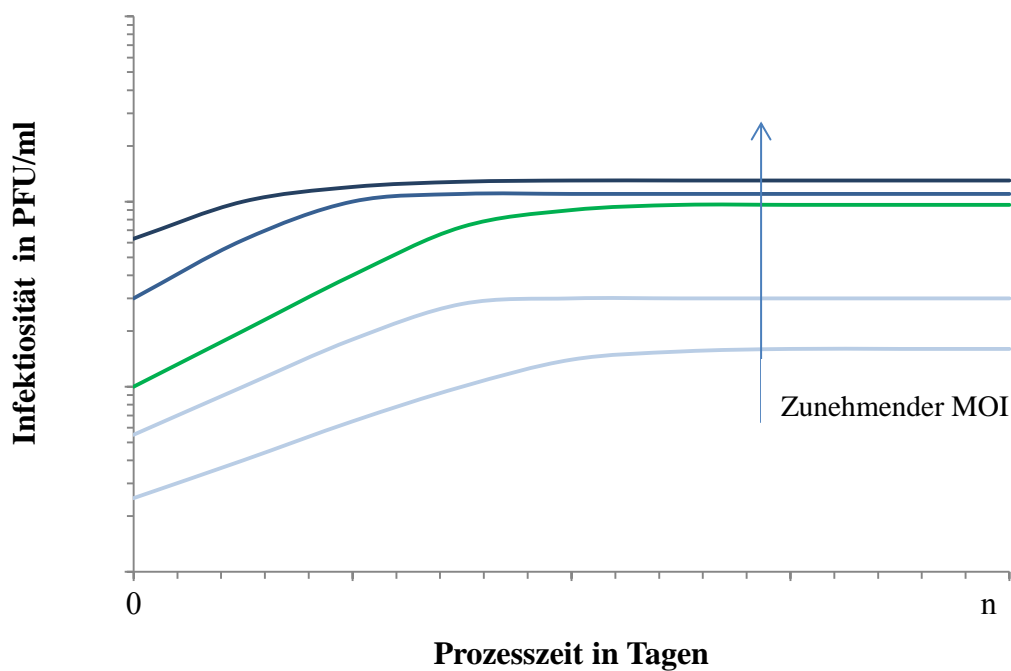


Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der Abhängigkeit des Virustiters vom MOI (nach Aggarwal et al. 2011 )

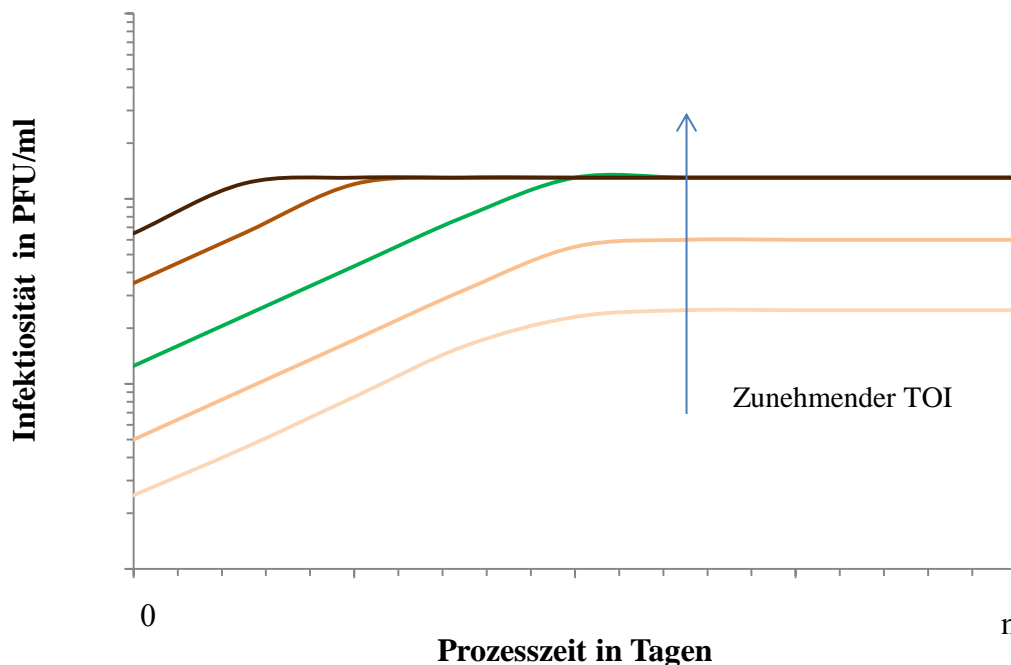


Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung zur Abhängigkeit des Virustiters vom TOI (nach Aggarwal et al. 2011 )

Die *time of infection* (TOI) entspricht der Lebendzellzahl in Kultur zum Zeitpunkt der Infektion. Der Zusammenhang mit der Virusausbeute stellt sich einfacher als beim MOI da.

Doppelt so viele Zellen können auch doppelt so viel Virus produzieren. Dennoch kann bei zu hohen TOI durch Kontaktinhibierung ein Plateau in der Zellzahl und folglich auch der Ausbeute erreicht werden (Abbildung 5). Eine Nährstofflimitierung wird durch eine hohe Startzellzahl und einen Mediumwechsel zu Beginn einer Infektion vermieden.

Der dritte wichtige Parameter, die *time of harvest* (TOH), ist der Zeitpunkt nach der Infektion an dem die Kultivierung gestoppt wird, beispielsweise durch Einfrieren des Kulturgefäßes bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Es muss sichergestellt werden, dass Proteine ihre Aktivität vollständig einstellen, insbesondere Proteasen, RNasen und DNasen, um replizierte Viruspartikel zu schützen. Je höher der MOI eingestellt worden ist, desto früher sollte der TOH gewählt werden, um die unvollständige Replikation von Viren auf Grund von Nährstofflimitationen zu verhindern. Bei hohen MOI weist der TOH im Allgemeinen einen konstanten Wert auf. Wann der TOH gewählt werden sollte, ist davon abhängig wie das Einbetten des Virus in Hüllproteine der Zelle funktioniert. Eine unvollständige Replikation oder Behüllung kann zu dem sog. Passage Effekt führen, wobei virale Partikel mitgeschleppt werden, die u.U. in der nächsten Infektion einen Vorteil durch ihr kürzeres Genom besitzen und zu einer Qualitätsabnahme des Virusstocks führen (Krell 1996). Ebenfalls können Partikel entstehen, die nicht richtig umhüllt und daher nicht infektiös sind.

### 3.3 Desinfektionsstudien

Essentielle Fragestellungen bei allen Krankheiten sind neben diagnostischen Methoden die Behandlungen der Krankheit sowie eine zuverlässige Desinfektion, um eine weitere Verbreitung der Krankheit eindämmen zu können. Da die Desinfektionsmethoden in diesem Projekt eine zentrale Frage darstellen werden unten die bisher in der Literatur beschriebenen Stabilitätsuntersuchungen für KHV und VHSV kurz zusammengefasst.

In der bisher veröffentlichten Literatur wurden viele allgemeine Desinfektionsmittel vorgestellt, um das Virus aus Lösungen oder Sedimenten zu entfernen. So stellen Kasai *et al.* 2005 vor, KHV in Lösungen mit Iod, Natriumhypochlorit, Benzalkonium Hypochlorit oder mit Ethanol zu desinfizieren. Daneben bestimmten sie auch die Menge an UV-Strahlung von  $4 \times 10^3 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$  oder die Hitzeeinwirkung von  $50^{\circ}\text{C}$  über eine Minute, die für eine Desinfektion ausreichend sind.

Daneben wurden weitere Untersuchungen zur Stabilität des KHV in Gewässern und ihrem natürlichen mikrobiellen Umfeld durchgeführt. In unbehandelten Wasserproben aus unterschiedlichen Seen sowie Sedimenten in Japan, die mit autoklaviertem Wasser benetzt worden sind, fiel die Infektiosität von KHV-Isolaten mit einem Anfangstiter von  $10^{3,8} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$  innerhalb von drei Tagen unter die Nachweisgrenze (Shimizu *et al.* 2006). Weitere Versuche mit Gewässern, die einen Karpfenbestand aufwiesen, bestätigen diese Ergebnisse. Yoshida *et al.* 2013 versetzten Teichwasser mit  $5 \times 10^5 \text{TCID}_{50}/\text{L}$ , inkubierten es für eine oder 72 Stunden bei  $23^{\circ}\text{C}$  und benutzten so vorbereitete Wasserproben um deren Infektiosität in den Fischversuchen zu prüfen. Alle Fische die später in der ersten Wasserprobe (nach 1 h Inkubation mit Virus vor Infektionsversuchen) platziert wurden zeigten ein Krankheitsbild während in der zweiten Gruppe keine Erkrankung der exponierten Fische beobachtet werden konnte.

Beim VHSV wurde neben der starken Empfindlichkeit gegenüber Formalin, das zu einer Inaktivierung nach fünf Minuten führte, ebenfalls die Verschiebung des pH-Werts hin zum sauren pH 2,5 oder zum Basischen pH 12 beschrieben. Dabei konnte das Virus in wenigen Minuten, respektive 2 Stunden inaktiviert werden. Innerhalb von 48 Stunden

nahm die Infektiosität in einem toten Raubfisch ab. In Teichsediment widerstand das VHSV weniger als einen Tag bei Raumtemperatur (Licek *et al.* 2011).

## 4 Material und Methoden

Alle zellkulturtechnischen Arbeiten wurden im Labor des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik (BVT) durchgeführt. Die molekularbiologische Diagnostik erfolgte am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL).

### 4.1 Zellkulturtechnik

Zur Etablierung der *in vitro* Versuche werden charakterisierte Zellkulturen benötigt. Diese müssen für verfahrenstechnische Aspekte auf Parameter wie Wachstumsverhalten unter Temperatur- und Medienvariation sowie schließlich der Replikation der Viren ausgelegt werden. Die Stammhaltung der verwendeten Zellen erfolgt in T75-Flaschen (Sarstedt) bei 20°C. Das hat eine Reduktion des Stoffwechsels und eine längere Passagierzeit zur Folge.

#### 4.1.1 Charakterisierung der *Common Carp Brain* Zellen

Die Zellkultur wurde vom nationalen Referenzlabor für Fischkrankheiten des Friedrich-Loeffler-Instituts auf der Insel Riems zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um virusempfindliche, aus Karpfengehirn isolierte Zellen (CCB), die in Passage 83 erhalten wurden (Neukirch *et al.* 1999).

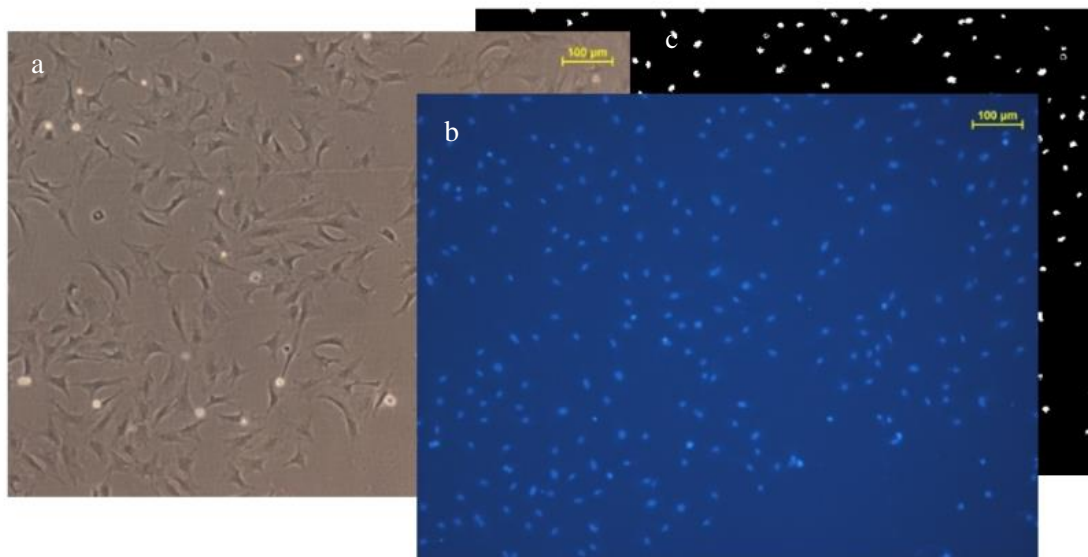


Abbildung 6: Aufnahmen von CCB-Zellen, zur automatisierten Zählung mit Höchst 33342

a) Eine lichtmikroskopische Aufnahme von CCB-Zellen mit 10 x Vergrößerung b) Mit UV (260 nm) angeregte mikroskopische Aufnahme 10 x vergrößert c) Binarisiertes Bild zur besseren automatisierten Auszählung

Zur Ermittlung des Wachstumsverhaltens, der Populationsverdopplungszahlen bzw. der spezifischen Wachstumsrate, werden die Zellen in 24-Mikrotiterplatten ausgesät (Greiner BioOne). Weil es sich bei den CCB-Zellen um adhärenzte, Fibroblasten artige Zellen handelt, müssen sie zur Zählung in Neubauerkammern mittels Accutase® vom Untergrund

gelöst und in einem definierten Medium verdünnt werden. Eine elegantere Lösung besteht im Anfärben der Zellkerne mittels Höchst 33342 einem durch UV-Licht anregbaren Farbstoff, der durch die Zellmembran vitaler Zellen transportiert werden kann. Mit einer Stocklösung aus 6 mg/mL in Reinstwasser genügt 1  $\mu$ L je Kavität, um innerhalb von 5 Minuten alle Zellkerne zu visualisieren. Mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon TE 2000-U, Intensilight C-HGF) und der dazugehörigen Software (NIS-Elements BR 3.00) lassen sich die angeregten Kerne in einem aufgenommenen Bildausschnitt bekannter Fläche automatisiert zählen. Daraus lässt sich die benötigte Zellzahl je Quadratzentimeter berechnen (Abbildung 6).

In Vorversuchen werden die beiden Medien DMEM und MEM verglichen, die sich in ihrer Zusammensetzung und ihren Puffersystemen unterscheiden. Das DMEM *high glucose* wird mit 10 % FKS, AB5955 (10.000 units Penicillin, 10 mg Streptomycin, 25  $\mu$ g Amphotericin B in Citrat Puffer) und 25 mM HEPES supplementiert. Durch seinen niedrigen Natrium-Hydrogencarbonatgehalt von 0,5 mM wird die Pufferung auf pH 7,44 bei Atmosphärenbedingungen realisiert. Das MEM wird neben den Additiva im DMEM noch mit nicht-essentiellen Aminosäuren (M7145) versetzt. Durch den Gehalt von 2,2 g/L (26 mM) Natrium-Hydrogencarbonat erfolgt die Pufferung auf pH 7,44 bei 5% CO<sub>2</sub>. Alle hier genannten Medien und Salze ausgenommen des FKS (Biochrom GmbH) wurden von der Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland erworben.

#### 4.1.2 Charakterisierung der *Rainbow Trout Fin* Zellen

Bei der als RTF abgekürzten Zelllinie handelt es sich um aus dem Sonnenbarsch (*Lepomis macrochirus*) isolierte Flossenzellen. Die Zellen wurden zur näheren Charakterisierung auf Ihr Wachstumsverhalten in verschiedenen Medien untersucht. Bedingt durch die Arbeiten während des Sommers und dem Fehlen eines geeigneten Kühlbrutschranks konnten keine Temperaturen unter 20°C zur Proliferation gewählt werden. Die beiden verwendeten Medien (DMEM und MEM, vgl. 4.1.1) unterscheiden sich hauptsächlich in der Art der Pufferung und im Kohlenhydratgehalt. Durch Ablösen mittels Accutase® und anschließender Zählung in Neubauer-Kammern werden spezifische Wachstumsrate, minimale Zelldichte und maximale Zelldichte im Monolayer ohne Medienwechsel ermittelt. Ein Medienwechsel kommt während der Infektion nicht in Frage, da zwangsweise Virus entfernt und die Ausbeute reduziert werden würde.

#### 4.1.3 Herkunft des verwendeten KHV-TP 30

KHV-TP 30 isoliert durch Dr. Peiyu Lee (Taiwan, 2005) wurde vom Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) zur Verfügung gestellt. Das Virus wurde auf Trockeneis als Zellkulturüberstand versendet und im Haus mehrfach passagiert und vermehrt, bevor die Versuche durchgeführt werden konnten.

#### 4.1.4 Herkunft des VHSV

Das verwendete VHS-Virus stammt ebenfalls vom Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) auf der Insel Riems. Es handelt sich hierbei um das Isolat Fi13, das in RTG-Zellen passagiert worden ist (Enzmann *et al.* 1989). Der Materialtransfer fand über das Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) statt, wo das Virus auf RTF-Zellen bei den routinemäßigen Untersuchungen als Positivkontrolle mitgeführt wird.

## 4.2 Analytische Methoden

Zum Nachweis der Viren gibt es amtlich anerkannte Vorschriften, die sich auf die Extraktion aus Gewebe von Fischproben beziehen. Im Falle des VHSV ist ein Isolat auf empfänglichen Zellkulturen durchzuführen die in allen bekannten Fällen nach der Inokulation einen cytopathischen Effekt (CPE) zeigen. In einem weiteren Schritt kann mittels RT-PCR das VHSV bestätigt werden.

Beim KHV ist diese Strategie nicht zielführend, da in vielen Fällen eine Empfänglichkeit in Zellkulturen ausbleibt. Aus diesem Grund hat sich die Isolation der DNA mit anschließendem Nachweis in der qPCR als amtlich anerkannte Methode etabliert. Der hieraus resultierende Nachteil ist, dass Nukleinsäuren eine hohe Stabilität aufweisen, weshalb nicht intakte oder nicht umhüllte Viren in die Quantifizierung eingeschlossen werden.

Um zuverlässige Daten aus den Desinfektionsversuchen zu erzeugen, wurde die Endverdünnungsmethode zum Infektiositätsnachweis für beide untersuchten Viren herangezogen.

### 4.2.1 Endverdünnungsmethode zur Infektiositätsbestimmung

Bei der oben erwähnten Endverdünnungsmethode, auch *Tissue Culture Infective Dose 50 %* (TCID<sub>50</sub>) genannt, wird eine Virussuspension in Zehnerpotenzen verdünnt, auf Zellen inkubiert und nach 10 Tagen auf das Auftreten des cytopathischen Effekts untersucht. Die statistische Auswertung erfolgt nach Reed und Muench 1938.

#### **Koi-Herpesvirus:**

In einer 96-Mikrotiterplatte (Greiner BioOne) werden Zellen mit einer Dichte von 50.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Als Medium wird DMEM/10 % FKS verwendet, weil der Einfluss des Kohlenstoffdioxidgehalts in der Atmosphäre bei den eingesetzten Volumina von 100 µL im MEM zu einer pH-Verschiebung führen und deshalb die Zellen schädigen würde. Die Inkubation erfolgt bei 25°C unter Atmosphärenbedingungen. Nach 24 Stunden sind alle Zellen angehaftet und befinden sich wieder in der logarithmischen Phase, die eine Virusinfektion begünstigt. Der Überstand aller Kavitäten wird abgenommen und durch die vorbereitete Verdünnungsreihe des zu ermittelnden Virusstocks ersetzt. Nach zehn Tagen erfolgt die finale Ablesung der Platte, wobei alle Kavitäten optisch auf das Vorhandensein von infizierten Zellen untersucht werden. Typisch sind dabei vergrößerte Zellen, fehlender Zellrasen sowie die für das KHV-TP30 charakteristische Strukturen in den Zellen. Solche Kavitäten sowie die mit vollständig aufgelöstem Zellrasen werden als positiv deklariert.

#### **VHS-Virus:**

In einer 96-Mikrotiterplatte werden Zellen mit einer Dichte von 60.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Als Medium wird DMEM/10 % FKS verwendet, in dem auch die Infektion durchgeführt wird. Die Inkubation wird bei 20°C unter Atmosphärenbedingungen durchgeführt, die bei dem Virus zu einer hohen Replikation führt. Die Verdünnungsreihe wird auch hier nach 24 h in die Platte pipettiert und die Ergebnisse werden ebenfalls nach zehn Tagen abgelesen. Das VHSV zeigt einen stärkeren cytopathischen Effekt, als das KHV-TP30 und führt in betroffenen Kavitäten zu einer vollständigen Auflösung des Zellrasens. Kavitäten in denen nach zehn Tagen Strukturen wie auf Abbildung 12 erkennbar sind ohne das der Zellrasen vollständig aufgelöst ist, werden als positiv deklariert.



#### 4.2.2 Real Time Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von KHV-DNA

Neben der Auswertung der Virulenz wurde die amtlich anerkannte Methode mittels PCR zum Nachweis der Virus-DNA für KHV eingesetzt. Die DNA-Extraktion für die PCR erfolgt mittels Quiagen Blood&Tissue Kit nach Anleitung des Herstellers. Dazu werden 200  $\mu\text{L}$  des Probenmaterials benötigt. Die extrahierte DNA wird abschließend in 100  $\mu\text{L}$  TE-Puffer aufgenommen. Eine Normierung der DNA ist nicht notwendig, weil die gemessenen Konzentrationen in den repetitiven Versuchen nur kleine Unterschiede aufweisen. Als interne Kontrolle dient  $\beta$ -Actin, ein eukaryotisches Strukturprotein, wie es am LGL etabliert ist. Daneben wird die Messung mit einer weiteren internen Kontrolle durchgeführt, um die Extraktionsmethode zu plausibilisieren. Vor der Extraktion wird eine bekannte Menge ( $2 \times 10^5$  Kopien/ $\mu\text{L}$ ) einer synthetisierten DNA (eGFP) zur Probe gegeben. Mit einem zweiten Farbstoff, kann gleichzeitig mit dem KHV-Nachweis die Menge der internen Kontrolle quantifiziert werden (Hoffmann *et al.* 2006). Die PCR wird nach Gilad *et al.* 2004 mittels Hydrolyse-Sonden durchgeführt. Das verwendete Temperaturprofil weicht von dieser Veröffentlichung ab, weil mit einem anderem PCR-Kit sowie Thermocycler gearbeitet wurde. Beim Temperaturprofil konnte auf das Protokoll vom LGL zurückgegriffen werden, dass bereits validiert war. Kurz zusammengefasst werden nach einer 10-minütigen Denaturierung bei  $95^\circ\text{C}$ , 40 Zyklen mit 15 s bei  $95^\circ\text{C}$  und 60 s bei  $60^\circ\text{C}$  am Strategene MX3000P durchgeführt.

Als Positivkontrolle wird eine validierte Kontrolle des LGL verwendet. Als Negativkontrolle wird RNase-freies Wasser eingesetzt. Versuche wurden mindestens in Dubletten angesetzt. Zur Umrechnung in DNA-Kopien wurde ein Plasmid bekannter Konzentration mit einem Abschnitt des KHV-Genoms von der TiHO Hannover zur Verfügung gestellt.

#### 4.2.3 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von VHSV-RNA

Neben der Untersuchung zur Infektion von KHV an Sedimenten, sollte auch das VHSV in derselben Art und Weise beschrieben werden. Die am LGL verwendete Methode nutzt das N-Gen, das am stärksten in vom Virus befallenen Zellen repliziert wird für PCR-Nachweise des VHSV (Chico *et al.* 2006). Die validierte Methode vom LGL mit dem dort verwendeten OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) wird mit angepasstem Temperaturprofil nach Angaben des Herstellers am Thermocycler BioRad CFX Connect durchgeführt. Die RNA-Extraktion erfolgt nach dem Einfrieren der infizierten Kulturen bei  $-80^\circ\text{C}$  mittels RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Die Positivkontrolle wurde vom LGL bereitgestellt.

### 4.3 Optimierung einer Virusinfektion

Hierzu werden verfahrenstechnische Parameter wie MOI, TOI und TOH variiert und die Infektiosität sowie der DNA-Gehalt des Virus gemessen. Alle Versuche werden in T25-Zellkulturflaschen (Sarstedt) durchgeführt. Die Inkubation erfolgt in MEM bei  $25^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$ , da sich bei diesen Bedingungen die Proliferation der Zellen, bei gleichzeitiger Virusreplikation als ideal erwiesen hat. Die Infektion erfolgt immer 24 h nach Aussaat der Zellen, um sicher zu stellen, dass alle Zellen angehaftet sind. Der Überstand wird abgenommen und die Kultur mit vorher in frischem Medium eingestellter Virussuspension inkubiert. Dazu wird 1 mL der Virussuspension verwendet, um die lokale Konzentration von Viruspartikeln zu erhöhen, bevor die infizierte Kultur wieder auf das Gesamtvolumen von 7 mL Medium aufgefüllt wird.

Zur MOI-Optimierung wird unter konstant gehaltenem TOI von 60.000 Zellen/cm<sup>2</sup> die Menge an Virus variiert. Für die Optimierung des TOI werden die Startzellzahlen variiert, und in allen Versuchen der gleiche Virusstock verwendet. Am ersten Tag der Infektion wird die Endverdünnungsmethode am Virusstock durchgeführt, um den Start-MOI zu ermitteln. Anschließend werden täglich Infektiosität und Virus-DNA Gehalt aufgezeichnet, um Virus-Ausbeute und TOH zu ermitteln. Alle Flaschen werden zum gewählten TOH bei -80°C eingefroren, um sie später gleichzeitig auswerten zu können.

#### 4.4 Untersuchung der Qualität bayerischer Teichböden

Aus den vier bedeutenden Teichgebieten in Bayern (Tirschenreuth, Schwandorf, Aischgrund, Ansbacher Land) wurden aus insgesamt 86 Teichen kurz nach dem Ablassen im Herbst im Zeitraum von Oktober bis Mitte Dezember Bodenproben entnommen. Die Entnahmeorte sind in Abbildung 7 kenntlich gemacht.

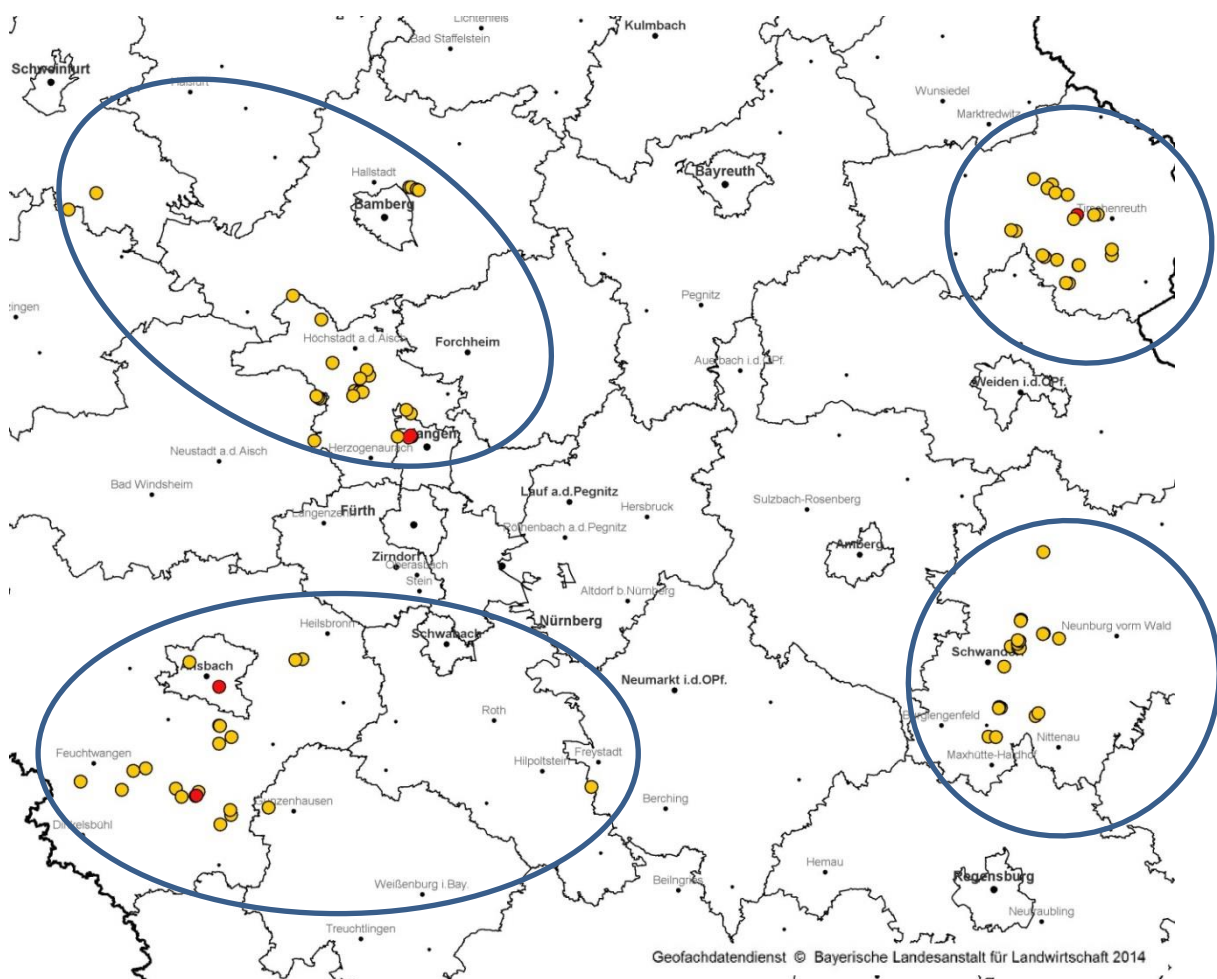


Abbildung 7: Lage der untersuchten Teiche

Vier Untersuchungsregionen: Aischgrund, Ansbacher Land, Tirschenreuth und Schwandorf; bei roten Messstellen wurde auch der Untergrund untersucht.

Von den übrigen Teichen wurde eine Mischprobe aus dem für die Teichfruchtbarkeit bedeutenden oberen Bodenbereichen genommen. Dabei wurden pro Teich vier Proben etwa aus der Mitte der jeweiligen Quadranten des Teiches gezogen. Die gewählten Stellen sollten nach Augenschein die typischen Bedingungen der Hauptfläche des Teiches aufweisen. Die Entnahme des Teichbodens erfolgt mittels Kelle. Es wurde dabei die oberste Bodenschicht bis zu 5 cm Tiefe entnommen. Pro Messstelle wurden 0,5 l Teichboden entnom-

men. Aus den vier Messstellen wurde eine Mischprobe hergestellt. Bei Teichen mit deutlich sandigen Flächen in den Uferbereichen wurde der Anteil der Sandböden an der Gesamtfläche geschätzt.

Folgende Parameter wurden im Teichboden untersucht:

- pH-Wert,
- Humusgehalt,
- Kationen-Austausch-Kapazität (T-Wert),
- Gesamt-P und  $P_{CAL}$  (leicht verfügbarer P),
- Gesamt-N sowie  $NH_4-N$  und  $NO_3-N$ ,
- Korngrößenverteilung und Bodenart.

Neben der Zusammensetzung des Teichbodens wurden noch folgende Parameter erfasst:

- Lage in Teichkette (Oben, Mitte, Unten),
- Bewirtschaftung im Wassereinzugsgebiet (Wald, Wiese, Acker),
- Dauer seit der letzten Entlandung und sonstige Besonderheiten.

Bei der Entnahme wurde für jede Entnahmestelle noch die Schlammtiefe gemessen, ein Foto erstellt sowie für die eindeutige Identifikation die GPS-Koordinaten vermerkt.

#### Statistische Auswertung

Die Daten der Stichproben pro Gruppe (Messwerte je Teichgebiet) wurden mit dem Kolmogorov-Smirnoff Test auf Normalverteilung überprüft. Bei gegebener Normalverteilung erfolgte Kontrolle der Varianzgleichheit (Bartlett-test) und die Überprüfung auf Gruppenunterschiede per einseitiger ANOVA. Als Post-hoc Test diente der multiple t-Test nach Student-Newman-Keuls. Bei nicht normalverteilten Daten wurde diese falls möglich per Box-Cox (Log)-Transformation hergestellt. Als nichtparametrischer Mittelwertsvergleich diente der Mann-Whitney (U-)Test nach Gruppenvergleich per Kruskal-Wallis (H-) Test. Das Signifikanzniveau wurde stets auf  $P < 0,05$  festgelegt. Signifikante Unterschiede sind im Ergebnisteil mit unterschiedlichen Hochbuchstaben gekennzeichnet. Die Überprüfung auf Zusammenhänge erfolgte bei metrischen Daten durch Ermittlung des Pearson's Korrelationskoeffizienten, bei Ordinalwerten durch die Spearman-Rangkorrelation. Auf eventuelle Abhängigkeiten der Variablen wurden weiterhin durch lineare Regressionsanalyse getestet und das jeweilige Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ermittelt.

## 4.5 Sorption an ausgewählte Matrices

Um ein Model zu etablieren, ob Viren an Sedimenten adsorbieren und infektiös bleiben können, wurden zuerst statische Bindungen an unterschiedlichen Materialien aufgezeichnet. Darunter findet sich zum einen gereinigter und geglähter Quarzsand (Sigma-Aldrich GmbH), repräsentativ für einen Anteil des Bodens in einem Fischteich und gleichzeitig ein definiertes Material mit bekannter Korngrößenverteilung von 100 - 300  $\mu m$ . Weiterhin lässt sich dieses Material durch Autoklavieren bei 121°C steril vorbereiten. Daneben wurde eine definierte Bodenprobe (Sp 2.44212) der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer gewählt, die eine größere Ähnlichkeit mit der Zusammensetzung eines Teichbodens aufweist, jedoch in den Parametern wie Korngrößenverteilung, Kationenaustauschkapazität, Anteil organischen Kohlenstoffs und pH-Wert definiert vorliegt und sich ebenfalls durch Autoklavieren bei 121°C sterilisieren lässt. Weiterhin wurden SPE-Materialien herangezogen, die sich in ihren physiko-chemischen Eigenschaften

deutlich voneinander und den Bodenproben unterscheiden. Als stark positiv geladenes Material wurde ein Silicagel verwendet, welches mit Aminien funktionalisiert ist (-NH<sub>2</sub>). Als hydrophobes Material wurde ein mit C18-Ketten funktionalisiertes Silicamaterial gewählt. Als drittes wurde noch ein Polymermaterial untersucht, das sich von den anderen durch eine Mischung aus hydrophoben und hydrophilen funktionellen Gruppen abhebt (Oasis® HLB).

An diesen Materialien wurden statische Bindungen dermaßen untersucht, dass bei konstant gehaltener Masse der Materialien, mit 100 mg je Reaktionsgefäß und einer Füllmenge von 1 mL Virussuspension, unterschiedliche Beladungen durchgeführt wurden. Nach einer Stunde unter konstanten Bedingungen von 25°C in einem Thermomixer bei 500 rpm (Thermo Scientific), konnte in allen Fällen ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption angenommen werden. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 5000 g wurde der Überstand abgenommen und zur quantitativen Analyse mittels qPCR, und im Fall der Quarzsand- und Bodenprobe in der Endverdünnungsmethode eingesetzt. Die Beladung entspricht der Differenz aus in jeder Konzentration mitgeführten Kontrolle in leeren Reaktionsgefäßen zu im Überstand gemessener Konzentration. Diese wurde gegen die Gleichgewichtskonzentration im Überstand aufgetragen, um die Adsorptionsisothermen zu erhalten.

#### 4.6 Desinfektionsversuche

Die Desinfektion wird definiert als Reduktion der Keimzahl um mindestens fünf Potenzen. Bei den verwendeten Viren wird der Begriff Desinfektion verwendet als Reduktion der Infektiosität in Endverdünnungsversuchen. Die Bestimmung mittels Endverdünnungsmethode hat eine Nachweisgrenze von 10 PFU/mL. Daher müssen Virusstocks von mindestens 1 10<sup>6</sup> PFU/mL vorliegen, um die Versuche durchführen zu können. Die Umrechnung des bestimmten Werts TCID<sub>50</sub>/mL in den anschaulicheren Wert PFU/mL, der auch zur Bestimmung der verfahrenstechnischen Parameter herangezogen wird, kann durch Umformen und Auflösen der beschreibenden Poisson-Verteilung erfolgen.

$$[\text{TCID}_{50}] = 0,69 \times [\text{PFU/mL}]$$

Alle Desinfektionsversuche wurden zuerst mit Lösungen durchgeführt, um die Einwirkdauer und die Dosis-Wirkungs-Kurven der zu untersuchenden Reagenzien zu bestimmen. Dabei wurden in Reaktionsgefäßen Volumina von 1 mL eingesetzt und auf die gewünschten Endkonzentrationen eingestellt. Die verwendeten Virusstocks lagen hierbei immer in Zellkulturmedium vor, um deren Stabilität zu gewährleisten. Zudem war das Zellkulturmedium mit Antibiotika versetzt, was eine Kontamination und den Verdau der Viren durch Einbringen von Mikroorganismen ausschließt. Um sicher zu gehen wurden trotzdem alle verwendeten Reagenzien durch 0,22 µm Polyethersulfon-Filter steril filtriert (Sarstedt). Weiterhin enthielt das Zellkulturmedium ein Anteil von 10 % FKS, wodurch eine Ähnlichkeit zu den Gewässern entsteht, die üblicherweise einen Anteil an organischen Verbindungen enthalten.

Als Desinfektionsmittel wurden Branntkalk (CaO), Peressigsäure (PES), Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sowie eine Protease (Neutrase®) ausgewählt. Der Branntkalk wirkt hauptsächlich durch die Erhöhung des pH-Wertes der Lösung. Um eine vollständige und einflussfreie Auswertung zu gewährleisten, müssen die mit Branntkalk desinfizierten Lösungen vor der Verwendung im Endverdünnungsverfahren neutralisiert werden. Dies geschah mittels steril filtrierter Salzsäure (0,1 M HCl). Beim Einsatz der Peressigsäure muss ebenfalls eine Neutralisation durchgeführt werden. Hier wurde Natronlauge (0,1 M NaOH)

eingesetzt. Neben dem Einfluss des sauren pH zeichnet sich PES dadurch aus, dass sie ein Reservoir für Wasserstoffperoxid darstellt, weil es in Wasser zu Essigsäure und Wasserstoffperoxid dissoziiert. Der Einfluss reinen Wasserstoffperoxids wurde deswegen parallel untersucht, auch wenn die Chemikalie in der ökologischen Aquakultur nicht zugelassen ist. Als eine zukunftssträchtige Methode wurde noch die Desinfektion mittels Protease untersucht, weil diese biologisch abbaubar und weniger aggressiv als die bisher zugelassenen Alternativen sind. Zudem kommen Proteasen aufgrund des Vorhandenseins von Mikroorganismen von Natur aus in Teichen vor.

Mit den ermittelten Konzentrationen aus diesen Versuchen wurden Desinfektionen von an Quarzsand adsorbierten Viren durchgeführt. Da die Desorption von Oberflächen eine Gleichgewichtsreaktion ist, können keine quantitativen Aussagen getroffen werden. Zur Überprüfung, ob adsorbierte Viren infektiös sind, wurde der Sand in Zellkulturflaschen eingebracht. Dies führt zu einer Ja-Nein-Aussage, ob die Desinfektion erfolgreich war und wurde qualitativ mit dem Mikroskop ausgewertet. Die verwendeten Endkonzentrationen sind dabei 0,01 M CaO, 0,1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,1 % PES sowie 50 mU/mL Neutrase®, um die in Quarzsand adsorbierten Viren zu desinfizieren.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Zellkultur

#### 5.1.1 Wachstumscharakteristik der CCB-Zelllinie

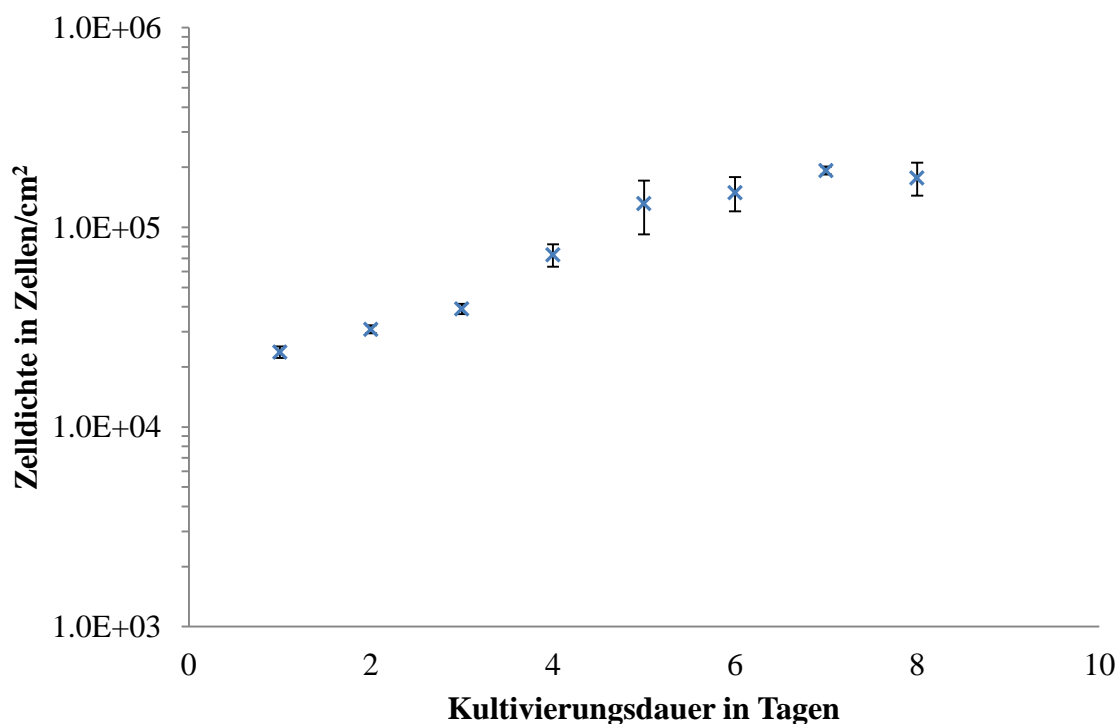


Abbildung 8: Wachstumskurve der CCB-Zellen in MEM bei 25°C und 5 % CO<sub>2</sub>

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte durch Färbung mit dem Lebendfarbstoff Höchst 33342, der mit der kleinen Furche der DNA interkaliert und mit UV angeregt sehr gut mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden kann. Nach einer leichten lag-Phase wuchsen die Zellen exponentiell bis Tag 6 und erreichten ein Plateau. Die notwendigen Größen, die sich hierbei ableiten ließen sind die spezifische Wachstumsrate von  $0,33 \text{ d}^{-1}$ , aus der sich die Populationsverdopplungszeit mit 50 h berechnen lässt. Die maximale Zelldichte, die im Monolayer erreicht werden konnte, beträgt  $160.000 \text{ Zellen/cm}^2$ .

### 5.1.2 Wachstumsverhalten der RTF-Zelllinie

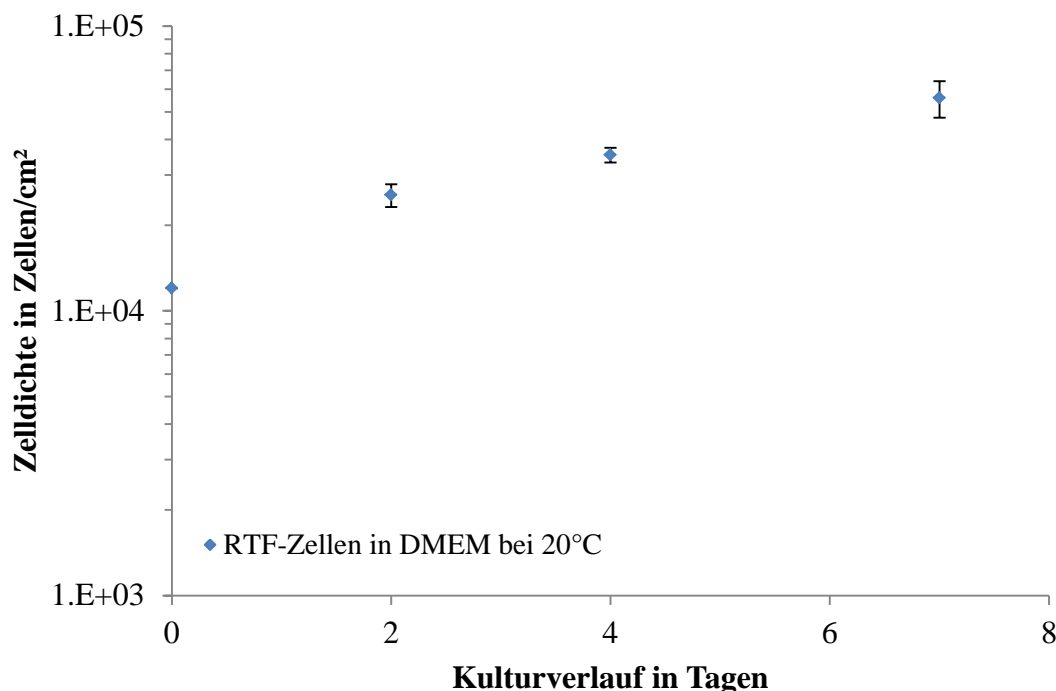


Abbildung 9: Wachstumskurve der RTF-Zellen in DMEM bei  $20^\circ\text{C}$

Aus der Wachstumskurve (Abbildung 9) ergeben sich für die Berechnung des MOI und TOI notwendige Größen. Die spezifische Wachstumsrate erreichte  $0,21 \text{ d}^{-1}$ , das umgerechnet einer Populationsverdopplungszeit von 79 h entspricht. Die maximale Zelldichte im Monolayer wurde in anderen Versuchen ermittelt und erreichte über  $300.000 \text{ Zellen/cm}^2$  ohne einen Mediumwechsel.

## 5.2 Infektionscharakteristik der verwendeten Viren

Bei Vermehrung in Zellkulturen wurden Mikroskopaufnahmen zur qualitativen Untersuchung der Viren durchgeführt. Weiterhin konnte in diesen Versuchen die zeitliche Abhängigkeit der Infektion zur Bestimmung der Ablesezeitpunkte für die Endverdünnungsmethode, sowie einer Abschätzung zur Virusernte mit hohen Titern erfolgen.

### 5.2.1 Infektionsverlauf des KHV *in vitro*

Neben der CCB-Zellkultur mussten die verwendeten Virusisolate untersucht werden, bevor die Optimierung durchgeführt werden konnte. Der Infektionsverlauf wurde optisch unter dem Mikroskop beurteilt. Auf Abbildung 10 lässt sich erkennen, dass sich die Zellen bei dem gewählten MOI von 0,09 bis zum zweiten Tag nach der Infektion teilten. An die-

sem Tag wurden erste morphologische Änderungen weniger Zellen erkennbar. Der für das KHV typische cytopathische Effekt (CPE) wurde erst fünf Tage nach der Infektion vollständig erreicht. Insgesamt war der Infektionsverlauf sehr schnell und die mikroskopischen Daten sprechen für eine vollständige Infektion aller Zellen etwa drei oder vier Tage nach der Infektion.

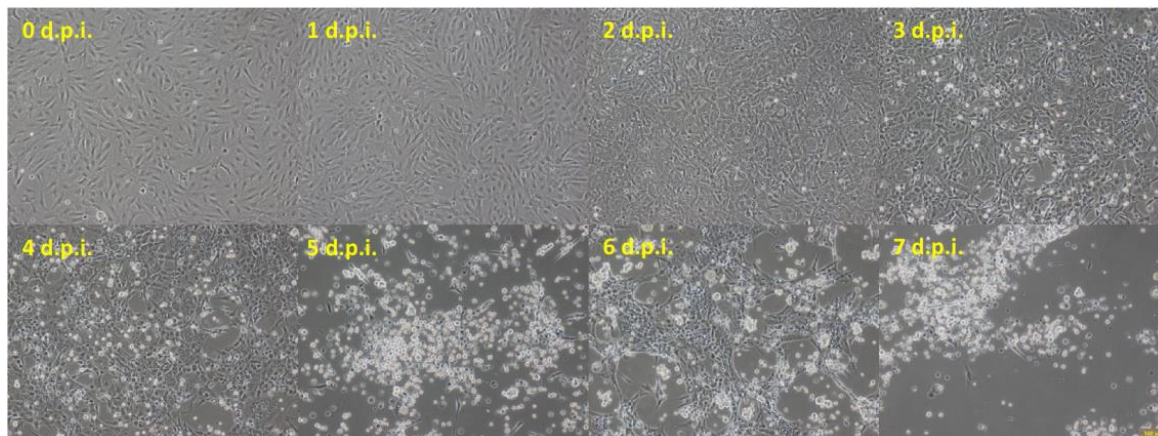


Abbildung 10: Infektionsverlauf des KHV-TP30 in CCB-Zellen

Die Infektion wurde in T25-Flaschen mit MEM bei 25°C und 5% CO<sub>2</sub> durchgeführt. Der gewählte MOI betrug 0,09, der TOI etwa 60.000 Zellen/cm<sup>2</sup>. Die TOH sind im Bild in Tagen nach Infektion (engl.: days past infection, d.p.i.) dargestellt.

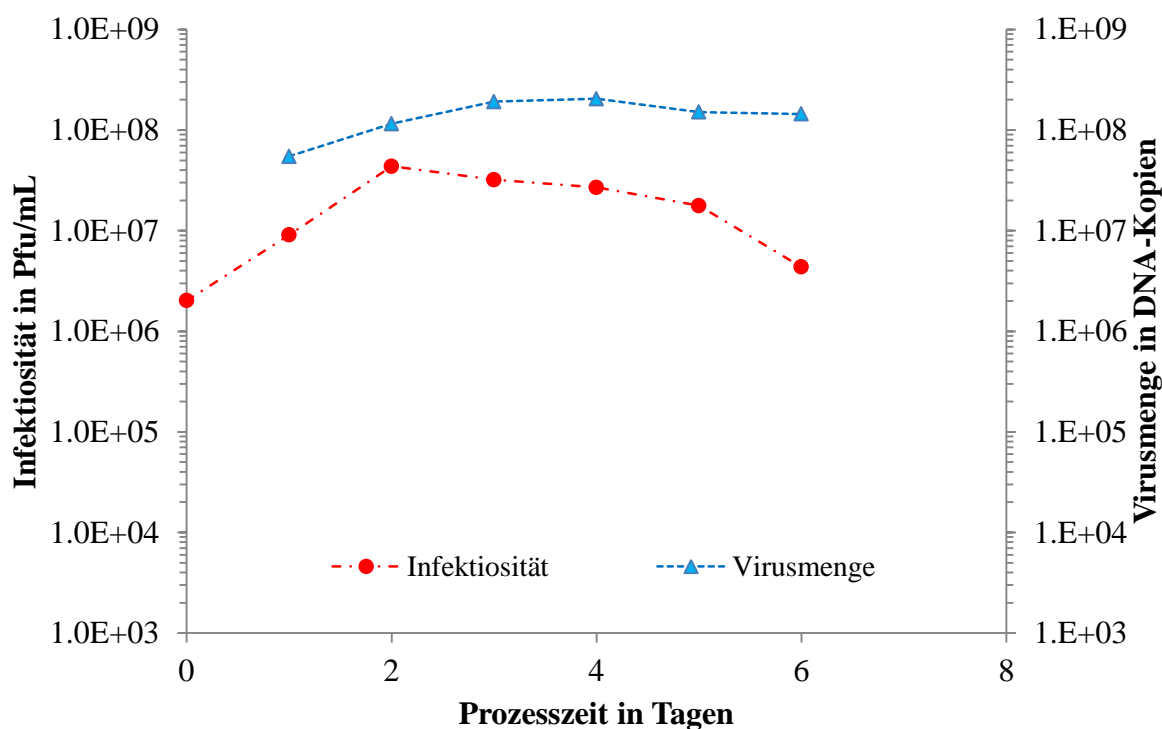


Abbildung 11: Quantitativer Infektionsverlauf von KHV-TP30 in vitro

Die Infektion wurde in T25-Flaschen mit MEM bei 25°C und 5% CO<sub>2</sub> durchgeführt. Der gewählte MOI betrug 0,09, der TOI etwa 60.000 Zellen/cm<sup>2</sup>. Dreiecke stehen für DNA-Kopien aus qPCR Messungen, Kreise für die Bestimmung der Infektiosität mittels Endverdünnungsmethode.



Betrachtet man die dazugehörigen quantitativen Analysen auf Abbildung 11, ergab sich eine Divergenz zwischen Virusreplikation und den beobachteten Auswirkungen auf die Wirtszellen. Die bestimmten Infektiositäten (rote Kreise) ausgedrückt in *Plug forming units per mL* wiesen bereits zwei Tage nach Infektion ein Maximum auf, das in den mikroskopischen Aufnahmen nicht vermutet worden wäre. Die Virus-DNA-Gehalte (blaue Dreiecke) erreichten erst drei Tage nach der Infektion ihr Maximum und blieben den restlichen Infektionsverlauf auf einem konstanten Niveau. Währenddessen nahm die Infektiosität ab Tag 3 mit der Zeit wieder deutlich ab, bis sie an Tag 6 um eine ganze Potenz gegenüber dem Maximalwert reduziert war. Die Abnahme der Infektiosität ab Tag 3 war nicht mit einer Zunahme an Virus-DNA korrelierbar. Daher wurden im Folgenden nur noch aus der Endverdünnungsmethode gewonnene Daten verwendet, um die Desinfektion darzustellen.

### 5.2.2 Infektionsverlauf des VHSV in vitro

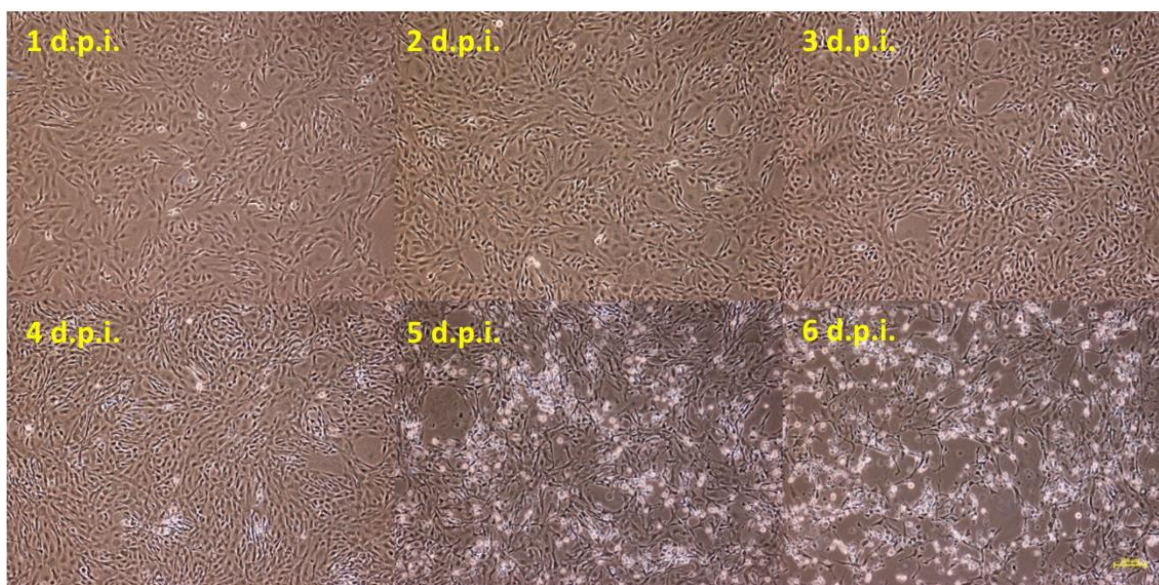


Abbildung 12: Infektionsverlauf von VHSV in RTF-Zellen in DMEM bei 20°C

Die Infektion wurde in T25-Flaschen mit DMEM bei 20°C durchgeführt. Der gewählte MOI betrug 1,5, der TOI etwa 78.000 Zellen/cm<sup>2</sup>. Die TOH sind im Bild in Tagen nach Infektion (engl.: days past infection, d.p.i.) dargestellt.

Wie auf Abbildung 12 zu erkennen ist, waren die morphologischen Änderungen der Zellen bei einer VHS-Infektion gegenüber der KHV-Infektion weniger stark ausgeprägt. Bis vier Tage nach der Infektion konnte ein Zellwachstum beobachtet werden. Ab dem dritten Tag nach der Infektion traten erste Infektionsherde auf. Ab dem fünften Tag lösten sich größere Flächen des Zellrasens von der Oberfläche der Zellkulturflasche.

### 5.2.3 Infektionsoptimierung des KHV-TP30

Um den Virustiter des KHV-TP30 weiter zu erhöhen, wurden neben der Bestimmung des richtigen TOH, der Prozesszeit bei der die Infektion maximal ist, durch die Untersuchung des Virustiters im zeitlichen Verlauf einer infizierten Kultur, die in Kapitel 3.2 vorgestellten Optimierungen des MOI und TOI durchgeführt.



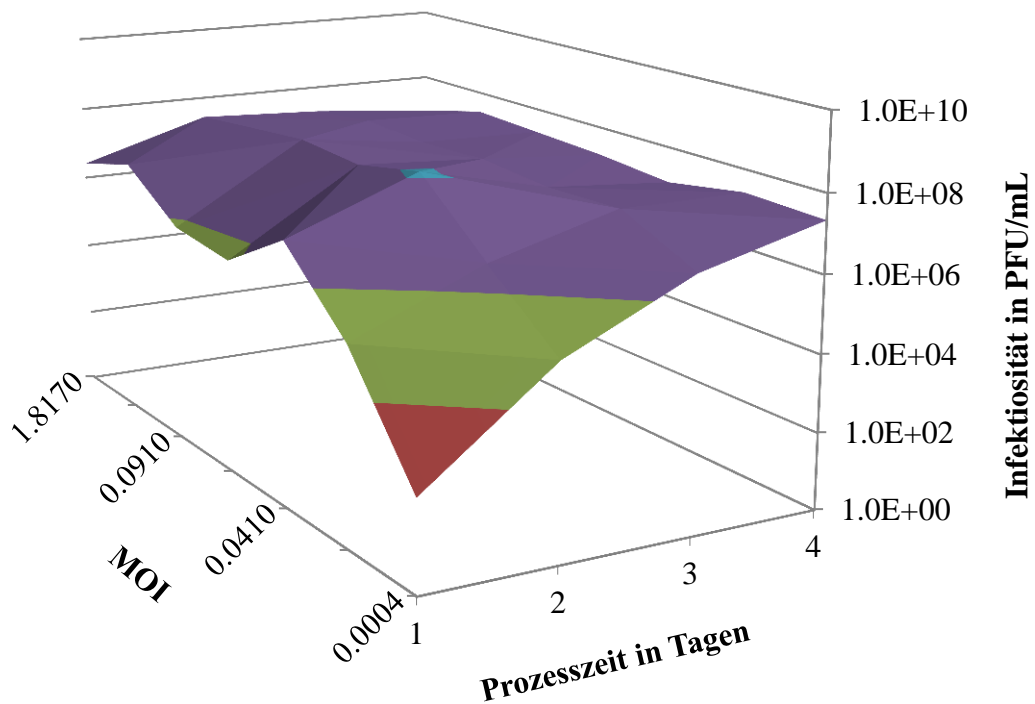


Abbildung 13: Einfluss des MOI auf den zeitlichen Verlauf der Infektiosität von KHV bei einem TOI von 60.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in MEM bei 25°C

In einer Versuchsanordnung von kleinen MOI mit vier infektiösen Viren je 10.000 Zellen bis zu einem Überschuss von zwei infektiösen Viren je Zelle sollte ein Optimum für den MOI ermittelt werden. Dazu wurde die Infektiosität mittels Endverdünnungsmethode bestimmt. Wie unter 3.2 beschrieben, wurde in den eigenen Ergebnissen (Abbildung 13) bei hohen MOI nur eine geringe Ausbeute erzielt. Die Infektiosität nahm bei MOI größer 0,04 innerhalb von 2 Tagen nach der Infektion um eine Zehnerpotenz auf ein Maximum zu und anschließend wieder ab. Beim kleinsten MOI von 0,0004 unterschied sich das erreichte Maximum nur unwesentlich von dem Plateau, das in allen Versuchsanordnungen aufgrund der konstant gehaltenen Startzellzahl mit einem TOI von 60.000 Zellen/cm<sup>2</sup> erreicht wurde. Die hohe Ausbeute konnte bei dem niedrigen MOI erst nach der doppelten Zeit, mit einem TOH von 4 Tagen erreicht werden, bevor die Infektiosität in der Folge wieder stagnierte. Als Optimum erwies sich in diesem Experiment ein MOI von 0,05. Der ideale TOH verringerte sich mit steigendem MOI bis er ab einem MOI von 0,05 bei etwa 2,5 Tagen nach der Infektion konstant blieb.

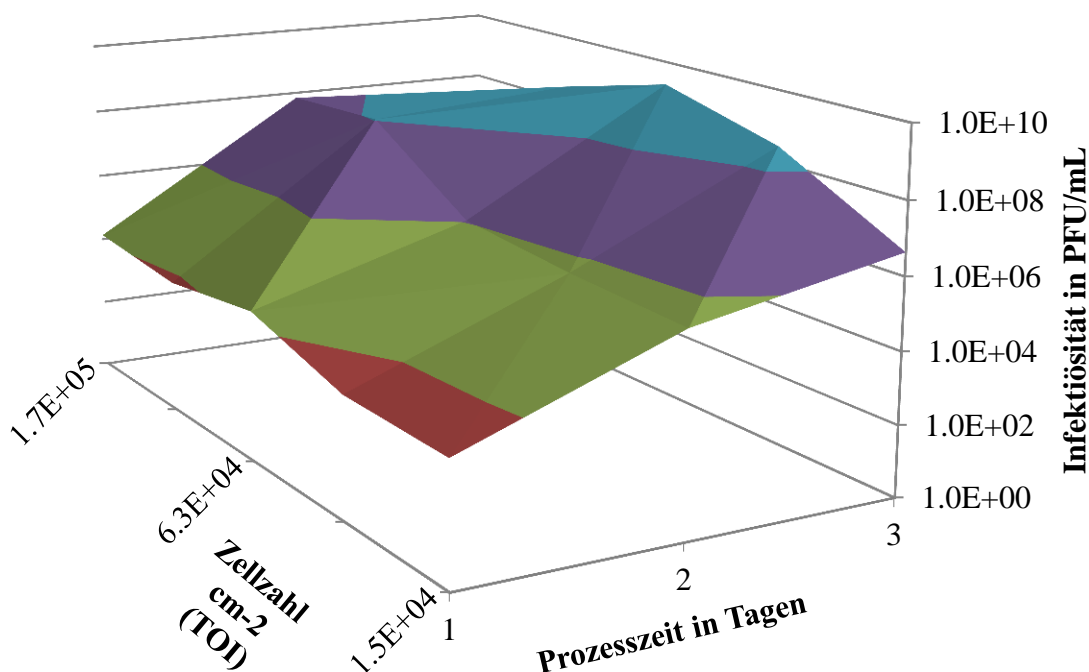


Abbildung 14: Einfluss der Zellzahl (TOI) auf den zeitlichen Verlauf der Infektiosität von KHV in MEM bei 25°C

Im Gegensatz zu den MOI-Optimierungen hatte die TOI-Variation starke Änderungen in der Infektiosität bewirkt. Bei Infektionsverläufen unter TOI-Variation von 15.000 Zellen/cm<sup>2</sup> – 170.000 Zellen/cm<sup>2</sup>, wird nur der Infektionsverlauf bis drei Tage nach der Infektion gezeigt (Abbildung 14). Ab Tag 4 war bei diesem MOI (0,005-0,02) in allen Kulturen eine starke Abnahme der Infektiosität zu verzeichnen. Bei dem höchsten TOI von 170.000 Zellen/cm<sup>2</sup> wurde die maximale Zelldichte im Kulturgefäß überschritten, wodurch es zu einer Kontaktinhibierung und damit verringerter Infektiosität kommt. Bei niedrig gewählten TOI war eine lag-Phase zu erkennen, die die Replikation des Virus beeinträchtigte. Zwei Tage nach der Infektion nahm die Produktionsrate deutlich zu. Am dritten Tag ließ sich wie in der Theorie beschrieben eine Zunahme der Virusausbeute mit Zunahme der Zellzahl in Kultur beobachten.

### 5.3 Beschaffenheit der untersuchten Teichböden

Bezüglich der Entlandung gab es in vielen Fällen keine eindeutigen Aufzeichnungen, da sie teilweise lange zurückliegen bzw. in einer Zahl an Anlagen nie durchgeführt wurden. Hier musste das Alter der Teiche geschätzt werden. Bei erfolgten Teilentlandungen wurde entsprechend ein Mittelwert ermittelt. Aufgrund der großen Bandbreite der Angaben ergibt sich in Bezug auf die Dauer seit der letzten Entlandung zwischen den Teichgebieten kein signifikanter Unterschied. Im Mittel wurden die Teiche das letzte Mal vor 80 Jahren entlandet. Die Bandbreite liegt zwischen 4 Jahren und 350 Jahren. Mit 131 Jahren ist die Dauer seit der letzten Entlandung im Ansbacher Land deutlich höher als in den anderen Teichgebieten.

Tabelle 3: Dauer seit der letzten Entlandung in Jahren

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	18	53 ± 52	10	200
Ansbacher Land	20	131 ± 99	9	350
Tirschenreuth	19	58 ± 54	4	200
Schwandorf	17	72 ± 59	18	200
<b>Insgesamt</b>	<b>74</b>	<b>80 ± 76</b>	<b>4</b>	<b>350</b>

In diesem Zusammenhang erschließt sich auch eine Korrelation mit der Schlammdicke in den Teichen. Die mittlere Schlammauflage in den Teichen beträgt 22 cm. Aufgrund der großen Bandbreite von insgesamt 0 cm – 200 cm ergeben sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Teichgebieten.

Tabelle 4: Mittlere Schlammdicke der untersuchten Teiche in cm

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	25	18 ± 11	0	40
Ansbacher Land	21	21 ± 16	2	80
Tirschenreuth	20	33 ± 50	5	200
Schwandorf	20	16 ± 7	1	30
<b>Insgesamt</b>	<b>86</b>	<b>22 ± 26</b>	<b>0</b>	<b>200</b>

Zwischen den Teichgebieten gab es bei vielen Parametern deutliche Unterschiede. Bezüglich einer möglichen Bindung von Viren an Teichböden ist der Gehalt an Dreischicht-Tonmineralen und evtl. von Huminstoffen bzw. organischer Substanz interessant. Daher wurden die Böden bezüglich ihrer Kationenaustauschkapazität untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Kationenaustauschkapazität von Teichböden aus verschiedenen Regionen Bayerns in mmolc/kg

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	25	209 <sup>a</sup> ± 65	95	318
Ansbacher Land	21	195 <sup>a</sup> ± 74	86	372
Tirschenreuth	20	124 <sup>b</sup> ± 58	36	237
Schwandorf	20	146 <sup>b</sup> ± 64	52	284
<b>Insgesamt</b>	<b>86</b>	<b>171 ± 73</b>	<b>36</b>	<b>372</b>

Die Kationenaustauschkapazität der Teichböden beträgt durchschnittlich 171 mmolc/kg Boden. Die höchste Kationenaustauschkapazität weisen die Teichböden im Aischgrund mit durchschnittlich 209 mmolc/kg auf gefolgt von den Teichen im Ansbacher Land (195) Schwandorf (146). Mit 146 mmolc/kg ist sie in Tirschenreuth deutlich niedriger. Die frän-

kischen Teichböden weisen im Mittel eine signifikant höhere Kationenaustauschkapazität auf als die Teichböden in der Oberpfalz.

### 5.3.1 Zusammensetzung der Teichböden

Die Trockenmasse der Schlammproben betrug im Durchschnitt in allen 4 Entnahmegebieten ca. 35 % T (Min. 17 %, Max. 58 %).

*Tabelle 6: pH-Werte von Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns*

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	25	7,1 <sup>a</sup> ± 0,6	5,5	7,8
Ansbacher Land	21	6,7 <sup>a</sup> ± 0,7	4,8	7,5
Tirschenreuth	20	5,4 <sup>b</sup> ± 0,4	4,8	6,3
Schwandorf	20	5,7 <sup>b</sup> ± 0,5	4,9	7,0
<b>Insgesamt</b>	<b>86</b>	<b>6,3 ± 0,9</b>	<b>4,8</b>	<b>7,8</b>

Der durchschnittliche pH-Wert der Teichböden beträgt 6,3 und ist mit 7,1 am höchsten im Aischgrund gefolgt von der Region Ansbacher Land mit 6,7. Deutlich im sauren Bereich liegt er in Schwandorf mit 5,7 und Tirschenreuth mit 5,4. Der pH-Wert der Teichböden in der Oberpfalz ist im Mittel signifikant niedriger als in Franken.

*Tabelle 7: Tongehalt der Teichböden in Massenprozent*

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	25	35,4 <sup>a</sup> ± 13,4	12,7	62,2
Ansbacher Land	21	26,0 <sup>b</sup> ± 12,2	8,7	50,1
Tirschenreuth	20	25,0 <sup>b</sup> ± 9,8	7,9	43,2
Schwandorf	20	29,1 ± 15,7	7,6	70,7
<b>Insgesamt</b>	<b>86</b>	<b>29,2 ± 13,4</b>	<b>7,6</b>	<b>70,7</b>

*Tabelle 8: Schluffgehalt der Teichböden in Massenprozent*

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	25	36 ± 13	14	68
Ansbacher Land	21	26 ± 13	8	53
Tirschenreuth	20	34 ± 13	12	56
Schwandorf	20	26 ± 13	6	54
<b>Insgesamt</b>	<b>86</b>	<b>31 ± 14</b>	<b>6</b>	<b>68</b>

Der Tongehalt in den Teichböden beträgt im Mittel 29,2 %. Er ist im Aischgrund mit 35,4 % signifikant höher als im Ansbacher Land und Tirschenreuth mit 26,0 % bzw.

24,9 %. Bezüglich des Schluffgehalts waren zwischen den Gebieten keine signifikanten Unterschiede. Sie betragen im Mittel 30,8 %. Hingegen beim Sandgehalt sind signifikante Unterschiede vorhanden. Er ist im Aischgrund mit 29,0 % signifikant niedriger als im Ansbacher Land mit 47,7 % und tendenziell niedriger als in Tirschenreuth und Schwandorf mit 41,2 % bzw. 44,5 %.

Tabelle 9: Sandgehalt der Teichböden in Massenprozent

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	25	29 <sup>a</sup> ± 21	4	73
Ansbacher Land	21	48 <sup>b</sup> ± 23	2	82
Tirschenreuth	20	41 ± 22	11	80
Schwandorf	20	44 ± 25	5	54
Insgesamt	86	31 ± 14	6	87

Neben den Schlammauflagen in Teichen sind an manchen Stellen, in erster Linie im Uferbereich, immer wieder auch sandige Stellen zu sehen.

### 5.3.2 Gehalt anorganischer Verbindungen

Die Gehalte an NH<sub>4</sub>-N sind in den Teichböden Mittelfrankens mit durchschnittlich 8,8 mg/100 g niedriger als in Tirschenreuth mit 9,8 mg/100 g und Schwandorf mit 12,1 mg/100 g. Beim Nitrat-N zeigt sich eine ähnliche Richtung bei 0,15 mg in den fränkischen Teichböden gegenüber 0,17 mg in den oberpfälzischen Proben (Tabelle 17).

Die Gehalte an Calcium sind im Aischgrund und Ansbacher Land mit 155,8 bzw. 151,2 mg/100 g gleich hoch und signifikant höher als in Tirschenreuth mit 94,68 mg/100 g. Die Werte in Schwandorf bewegen sich mit 132,3 mg/100 g dazwischen (Tabelle 19). Die Gehalte an Magnesium sind in den Teichgebieten Frankens mit 44,8 mg/100 g und im Ansbacher Land mit 36,2 mg/100 g Boden signifikant höher als in den Teichböden der Oberpfalz mit 23,6 mg/100 g in Tirschenreuth bzw. 17,6 mg/100 g in Schwandorf (Tabelle 20).

Tabelle 10: Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> CAL) in mg/100 g Boden

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	25	25 <sup>bc</sup> ± 15	1	56
Ansbacher Land	21	32 <sup>ab</sup> ± 23	6	97
Tirschenreuth	20	16 <sup>c</sup> ± 12	2	46
Schwandorf	20	18 <sup>c</sup> ± 11	7	62
Insgesamt	86	23 ± 17	1	97

Tabelle 11: Gehalt an Gesamtposphor (P2O5) in mg/100 g Boden

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	25	155 ± 74	51	324
Ansbacher Land	21	167 ± 78	63	385
Tirschenreuth	20	200 ± 98	57	421
Schwandorf	20	186 ± 86	70	390
<b>Insgesamt</b>	86	175 ± 84	51	421

Die Werte für den Gehalt an Gesamtposphor streuen sehr stark in den einzelnen Teichgebieten. Es lassen sich hier keine signifikanten Unterschiede feststellen. Sie betragen in den Teichböden Tirschenreuths 200 mg/100 g. In den anderen Gebieten liegen sie niedriger (Aischgrund 153 mg/100 g, Ansbacher Land 166 mg/100 g und 186 mg/100 g in Schwandorf). Obwohl der Gesamtposphor in Tirschenreuth am höchsten ist, ist der Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor dort signifikant niedriger und mit 16 mg/100 g beinahe nur halb so hoch wie im Ansbacher Land mit 32 mg/100 g. Die Werte im Aischgrund bewegen sich hier mit 25 mg/100 g zwischen den Werten in der Oberpfalz und dem Ansbacher Land.

### 5.3.3 Gehalt organischer Verbindungen

Tabelle 12: Gehalt an Organischer Substanz von Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns (% der T)

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	25	6,2 <sup>bc</sup> ± 2,7	2,2	11,0
Ansbacher Land	21	8,4 <sup>ab</sup> ± 4,9	2,9	18,6
Tirschenreuth	20	9,9 <sup>a</sup> ± 5,8	2,1	21,2
Schwandorf	20	11,3 <sup>a</sup> ± 6,4	3,4	23,3
<b>Insgesamt</b>	86	8,8 ± 5,3	2,1	23,3

Der Gehalt an organischer Substanz variiert stark und ist in der Region Schwandorf mit 11,3 % höher als in Tirschenreuth mit durchschnittlich 9,9 %. Der Gehalt an organischer Substanz im Boden ist in den fränkischen Teichgebieten deutlich geringer mit 8,4 % im Ansbacher Land und 6,2 % im Aischgrund. Die Gehalte sind im Aischgrund signifikant niedriger als in der Oberpfalz.

### 5.3.4 Räumliche Variation der Parameter innerhalb ausgesuchter Teiche

An vier Teichen wurden vier Messstellen getrennt untersucht. Dabei wurde neben der Schlammauflage auch die Zusammensetzung des Untergrundes untersucht. Bei Betrachtung dieser Messstellen eines Teiches zeigt sich, dass innerhalb eines Teiches Unterschiede in der Zusammensetzung auftreten. Der Untergrund weicht in vielen Parametern von der Schlammschicht ab.

Tabelle 13: pH-Wert, Humusgehalt (% der T), Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor ( $P_2O_5$  CAL, mg/100 g Boden trocken) und Kationenaustauschkapazität (mmolc/kg) in der Schlammauflage sowie im Unterboden von Teichen in verschiedenen Teichregionen

		pH-Wert	Humusgehalt in %	$P_2O_5$ CAL in mg/100 g	T-Wert in mmolc/kg
<b>Aischgrund</b>	Oberboden	7,2	3,4	22,3	98,0
<b>(Dummsweiher)</b>	Unterboden	6,4	0,7	22,3	52,0
<b>Tirschenreuth</b>	Oberboden	5,0	7,4	7,3	47,8
<b>(Paulusschwang)</b>	Unterboden	5,1	2,6	3,3	22,9
<b>Ansbach 1</b>	Oberboden	7,4	3,3	46,1	125,4
<b>(Pfaffenweiher)</b>	Unterboden	7,3	1,6	35,4	77,0
<b>Ansbach 2</b>	Oberboden	5,7	18,5	25,5	223,0
<b>(Oberer Wegweiher)</b>	Unterboden	5,7	13,7	18,8	170,7

Die Ergebnisse zeigen deutlich den Einfluss des Untergrundes auf die Zusammensetzung des Schlammes auf. Teichböden mit niedrigem pH-Wert im Teichschlamm haben auch im Untergrund bereits einen niedrigen pH-Wert. Dieselben Zusammenhänge zeigen sich bei Betrachtung des Humusgehaltes, des Gehaltes an Phosphor und auch der Kationenaustauschkapazität. Auch in Bezug auf die Korngrößenklassen zeigt sich ein direkter Zusammenhang in der Beschaffenheit des Oberbodens mit der Zusammensetzung des Untergrundes (Tabelle 13).

Tabelle 14: Ton- (T), Schluff- (U) und Sandanteile (S) in der Schlammauflage sowie im Unterboden von Teichen der verschiedenen Regionen

		T in %	U in %	S in %
<b>Aischgrund</b>	Oberboden	17,0	23,0	60,0
<b>(Dummsweiher)</b>	Unterboden	11,2	13,1	75,7
<b>Tirschenreuth</b>	Oberboden	13,0	14,9	72,1
<b>(Paulusschwang)</b>	Unterboden	6,0	4,7	89,3
<b>Ansbach 1</b>	Oberboden	12,9	18,3	68,7
<b>(Pfaffenweiher)</b>	Unterboden	9,9	13,3	76,9
<b>Ansbach 2</b>	Oberboden	28,4	26,0	45,6
<b>(Oberer Wegweiher)</b>	Unterboden	20,4	18,6	61,0

## 5.4 Adsorptionsversuche mit Modellmatrices

### 5.4.1 Adsorption des KHV an Quarzsand und eine Bodenprobe

Die Adsorption an Erde und Quarzsand wurden untersucht. Neben den Reaktionsgefäßen mit je 100 mg Erde oder Quarzsand wurden als Kontrolle leere Reaktionsgefäße mitgeführt. Die Beladung der Materialien ergibt sich aus der Differenz der Konzentration der im Überstand nachweisbaren Viren in der Probe und der der im Überstand gemessenen Viruskonzentration der Kontrolle.

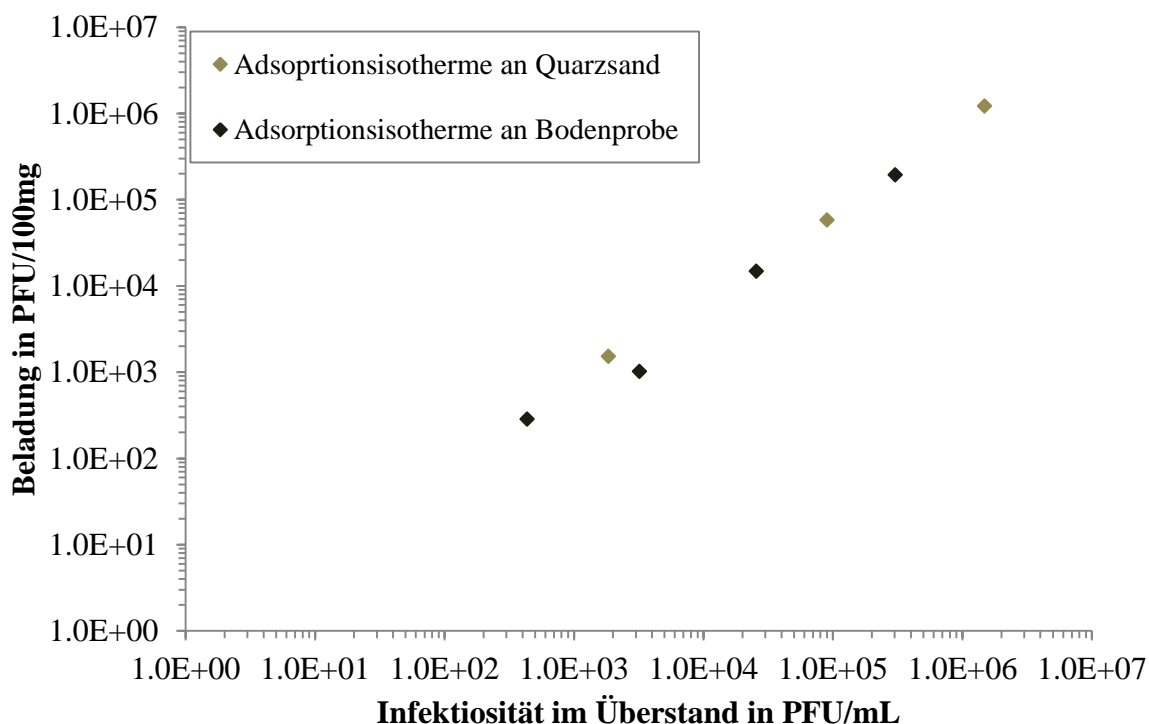


Abbildung 15: Beladung von KHV an Boden- sowie Quarzsandproben bestimmt durch die Endverdünnungsmethode

Die Variation der eingesetzten Viruskonzentration bei 100 mg Quarzsand je Reaktionsgefäß zeigte einen linearen Zusammenhang. Eine Sättigung war bei den gewählten Verhältnissen von Viren zu Quarzsand nicht aufgetreten (Abbildung 15). Auch die Verteilung bezogen auf die Nukleinsäure-Menge des Virus verlief linear (Abbildung 29). Trotz der unterschiedlichen Beschaffenheit von Quarzsand und der untersuchten Bodenprobe wiesen die Untersuchungen zur statischen Bindekapazität ähnliche Ergebnisse auf. In beiden Fällen betragen die Mengen adsorbierten Virusmaterials zwischen 30 % und 60 % und bewegen sich in der gleichen Größenordnung wie die eingesetzte Virusmenge.



### 5.4.2 Infektiosität des adsorbierten Virus

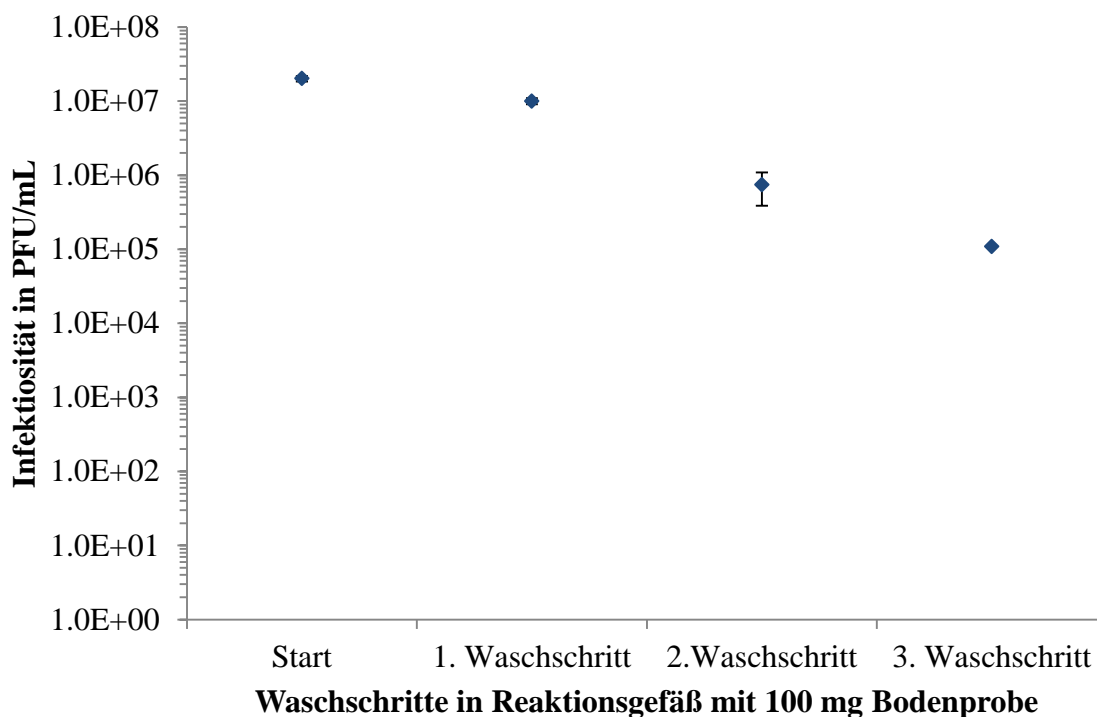


Abbildung 16: Waschschrirte zur Desorptionsuntersuchung von KHV in DMEM bei 25°C aus 100 mg Bodenproben

Um das Gleichgewicht der Adsorption und Desorption an den Materialien zu zeigen, wurden 100 mg der Bodenprobe mit hohen Mengen des KHV-Virus inkubiert und in mehreren Schritten mit frischem Medium gewaschen. Nach jedem Schritt, bei dem jeweils 90 % des Mediums ausgetauscht worden sind, wies der Überstand ein Zehntel der ursprünglichen Infektiosität auf (Abbildung 16). Die Bodenproben wurden schließlich in Zellkulturflaschen überführt. Alle Proben führten bei den CCB-Zellen zu einer Infektion.

### 5.5 Stabilität der Virussuspensionen

Die folgenden Versuche beziehen sich auf die Stabilität von Virusstocks, die in frischem Medium verdünnt worden sind. Alle Versuche wurden unter sterilen Bedingungen und Lichtausschluss durchgeführt.

### 5.5.1 Stabilität des Koi-Herpesvirusstocks

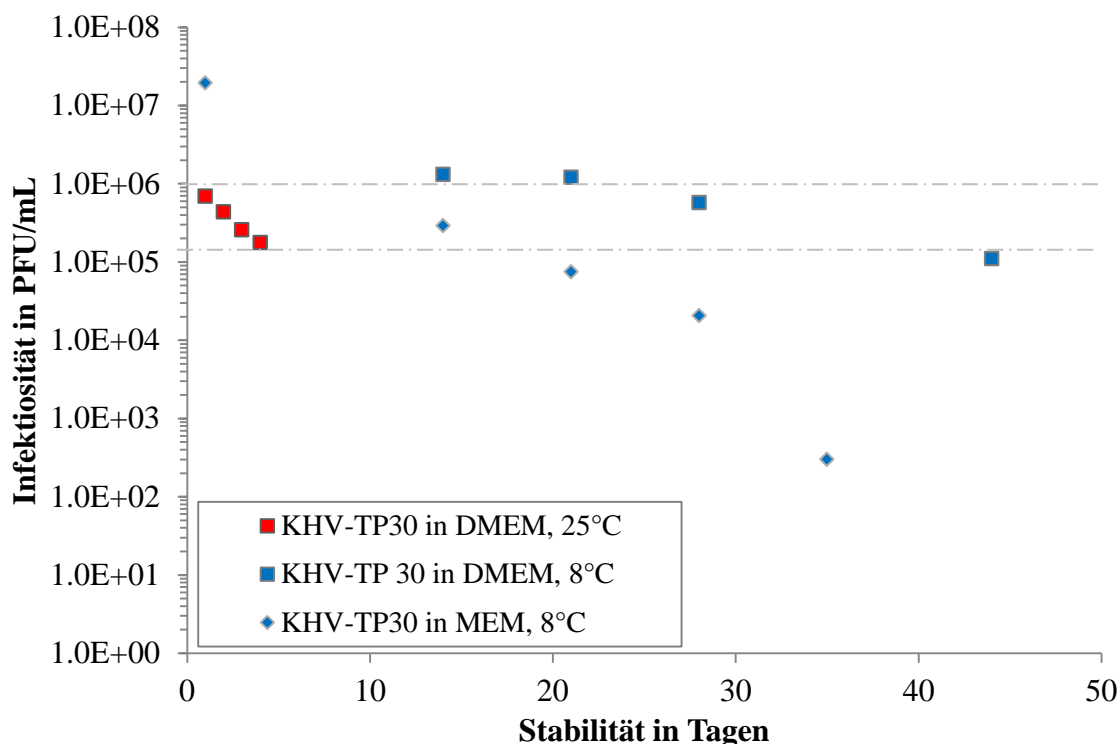


Abbildung 17: Stabilität von KHV-TP30 unter Temperatur- und Medienvariation

Verdünnungen in den beiden Medien, DMEM und MEM wurden im Kühlschrank und im Inkubator auf ihre Infektiosität über die Lagerzeit untersucht. Daten bei 25°C und MEM wurden wegen der hohen Instabilität nicht erneut aufgenommen (vgl. Abbildung 11). Bei 8°C in MEM war eine zunehmende Stagnation der Infektiosität zu beobachten. Die Abnahmen der Infektiositäten in DMEM verliefen linear. Bei 25°C verlor das KHV innerhalb von vier Tagen eine Zehnerpotenz seiner Infektiosität. Bei 8°C dauerte dieselbe Abnahme um eine Potenz etwa 20 Tage (Abbildung 17). Steril filtrieren des Virusstocks oder Verdünnen in PBS, zeigten keine positiven Auswirkungen auf die Stabilität.

Allen Stabilitätsversuchen gemeinsam war eine abweichende Interpretation durch die Bestimmung des DNA-Gehalts mittels qPCR. Die parallel aufgenommenen Daten wiesen in den Zeiträumen in keinem der verwendeten Medien eine Abnahme der Virus-DNA Menge auf (Daten nicht gezeigt).

### 5.5.2 Stabilität des Viralen Hämorrhagischen Septikämie Virusstocks

Die RTF-Zellen sowie die Infektionsversuche mit dem VHSV wurden ausschließlich in DMEM durchgeführt, weswegen auf Stabilitätsuntersuchungen in weiteren Medien verzichtet worden ist.

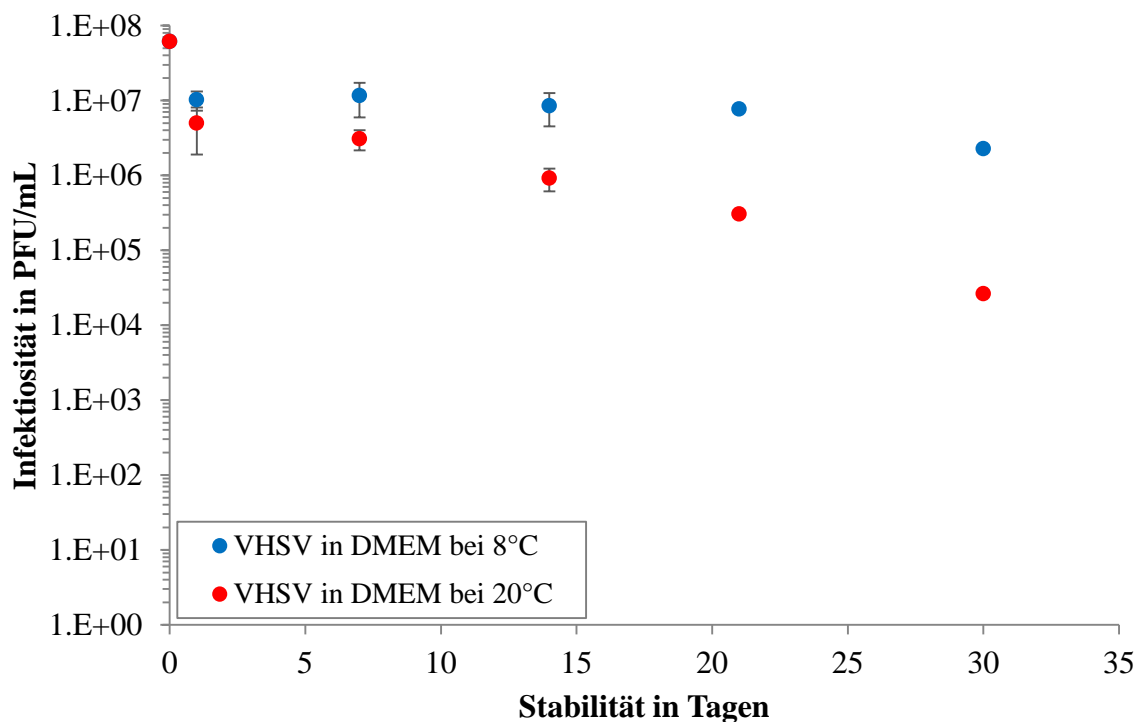


Abbildung 18: Stabilität von VHSV in DMEM bei 8°C und 20°C

Das VHSV wies gegenüber dem KHV eine erhöhte Lagerstabilität in Zellkulturmedium auf. Bei 8°C konnte über 14 Tage keine Abnahme in der Infektiosität über die Standardabweichung hinaus gemessen werden. Bei 20°C erfolgte eine Abnahme der Infektiosität um eine Zehnerpotenz innerhalb von 15 Tagen (Abbildung 18).

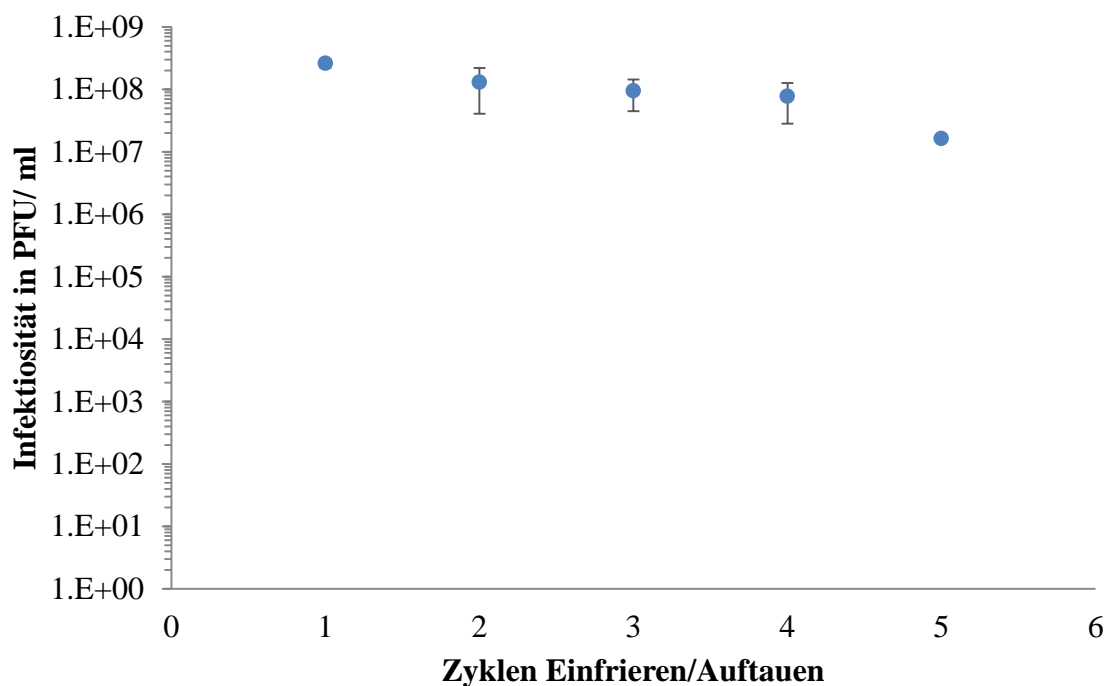


Abbildung 19: Einfluss von Gefrier- und Auftauzyklen bei -80°C auf die Infektiosität einer VHSV-Virussuspension

Um gleichbleibende Virusstocks zu gewährleisten, sollte die Infektiosität des Virus in Abhängigkeit der Zyklen von Einfrieren und Auftauen gezeigt werden. Die Reduktion um eine Zehnerpotenz konnte nach fünf Zyklen beobachtet werden (Abbildung 19). Bei jedem der vorhergegangenen Schritte konnte eine variierende Reduktion der Infektiosität gemessen werden.

### 5.5.3 Einfluss von pH auf das Virus

Viele Desinfektionsmittel, darunter auch Branntkalk und Peressigsäure wirken durch eine Veränderung des pH-Wertes. Um den Einfluss auf die Infektiosität zu untersuchen wurde daher der pH-Wert in der Lösung variiert und nach 24 stündiger Inkubation bei 8°C gemessen.

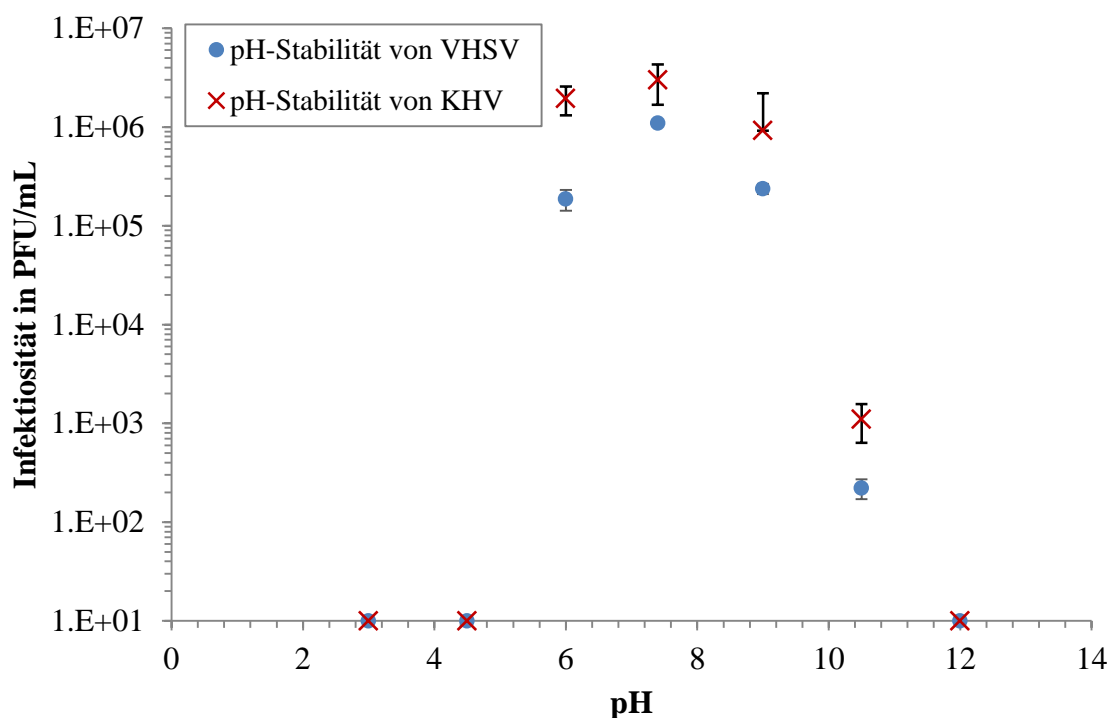


Abbildung 20: Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität des KHV-TP 30 und des VHSV in Medium bei 8°C und einer Verweilzeit von 24 h

Bei pH-Werten zwischen pH 6 und pH 8 war das KHV 24 Stunden lang stabil. Bei pH-Werten von < 4,5 konnte nach 24 Stunden keine Infektiosität nachgewiesen werden. Der gleiche Effekt zeigte sich auch bei pH 12. Bei basischen pH-Werten ist das Virus stabiler als bei Säuren. Die beiden pH-Werte 9 und 10,5 führten zu einer Reduktion, jedoch nicht zur vollständigen Inaktivierung (Abbildung 20). Die Ergebnisse zur Stabilität bei unterschiedlichen pH-Werten sind bei beiden Viren ähnlich. Das VHSV wies ebenfalls im basischen Milieu eine höhere Toleranz gegenüber dem pH-Wert auf als im sauren. Bei pH 10,5 waren nach 24 h bei 8°C von den ursprünglichen  $1 \times 10^6$  PFU/mL nur noch etwa  $2 \times 10^2$  PFU/mL infektiös.

## 5.6 Einfluss der Desinfektionsmittel auf die Infektiosität

Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Kurven der in ökologischen Aquakulturen zugelassenen Desinfektionsmittel wurden die Abnahmen der Infektiosität nach gleichbleibender Einwirkzeit untersucht.

### 5.6.1 Einfluss von Peressigsäure auf das Virus

Sowohl das KHV als auch VHSV wurde mit logarithmischen Verdünnungsstufen der Peressigsäure in Lösung behandelt.

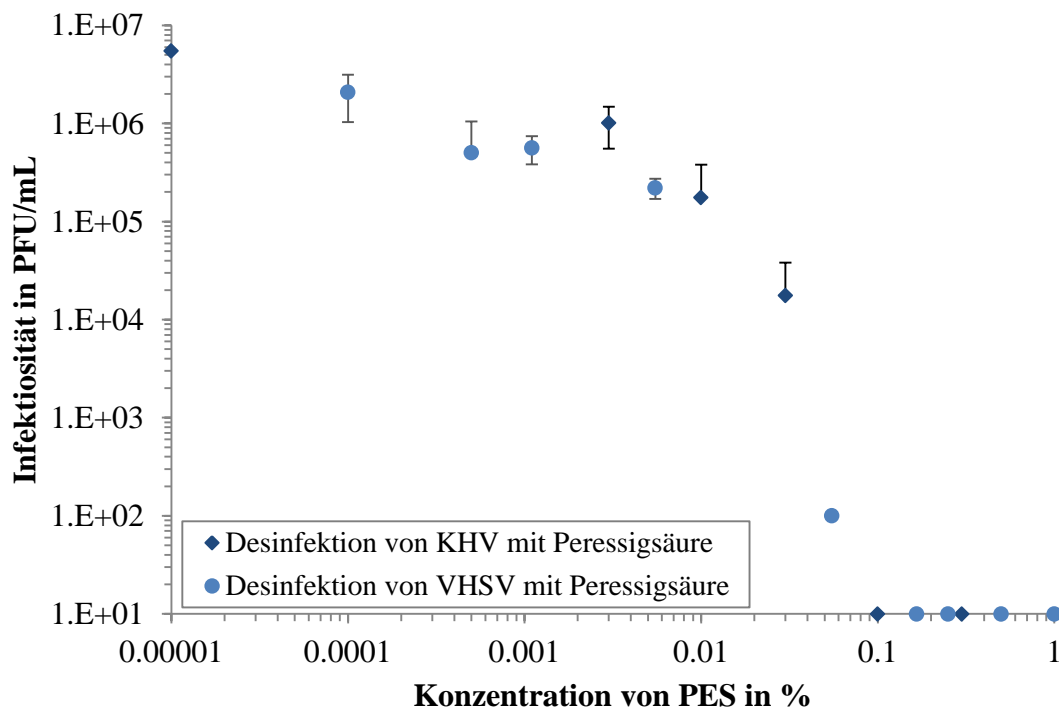


Abbildung 21: Desinfektion von KHV-TP30 und VHSV in DMEM mit Peressigsäure nach 24 h bei 8°C

Die Desinfektion einer Virussuspension mit einer Ausgangsinfektiosität von  $5,5 \times 10^6$  PFU/mL in DMEM war bei einer Endkonzentration von 0,1 % PES vollständig. Die Konzentration bei der eine Abnahme der Infektiosität um fünf Potenzen erfolgte, liegt etwas unter 0,1 % (Abbildung 21).

### 5.6.2 Einfluss von Wasserstoffperoxid auf das Virus

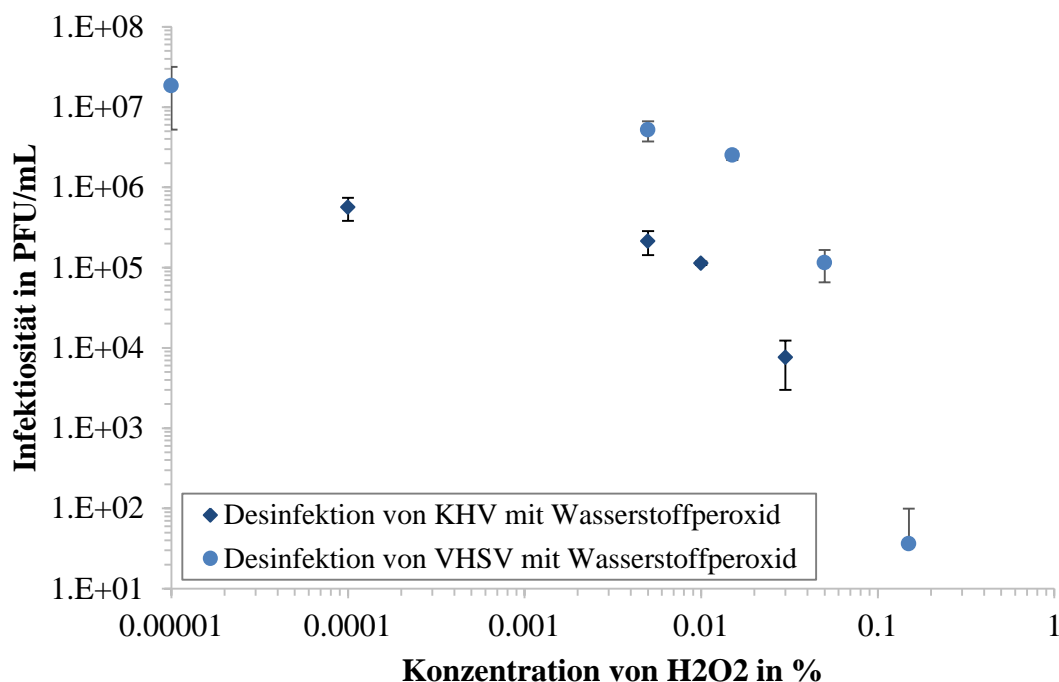


Abbildung 22: Desinfektion von KHV-TP30 und VHSV in DMEM mit Wasserstoffperoxid nach 24 h bei 8°C

Beim Einsatz von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) als Desinfektionsmittel stellte sich ein ähnlicher Verlauf wie bei der Peressigsäure ein. Die Endkonzentration an  $H_2O_2$ , die für die Reduktion des KHV unter die Nachweisgrenze benötigt worden ist, betrug ebenfalls 0,1 %. Hierbei konnte keine Verschiebung des pH-Wertes in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration beobachtet werden. Die Ausgangsinfektiosität von  $2 \times 10^7$  PFU/mL des VHSV konnte mit 0,15 % der  $H_2O_2$ -Konzentration unter die Nachweisgrenze reduziert werden (Abbildung 22).

### 5.6.3 Einfluss von Branntkalk auf das Virus

Durch die Stabilitätsversuche unter pH-Variation kann der Einfluss von Branntkalk abgeschätzt werden. Nach Erreichen eines pH-Werts größer als 12, der bei 10 mmol/L CaO erreicht wird, werden beide Viren inaktiviert. Wegen der schwer abschätzbaren Pufferkapazität des Zellkulturmediums wurden Verdünnungsversuche durchgeführt, um die dazu notwendigen Konzentrationen zu bestimmen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Einfluss der Pufferkapazität der verwendeten Medien auf den pH-Wert von Brannkalk Lösungen

CaO in H <sub>2</sub> O [M]	pH	CaO in DMEM/FKS [M]	pH	CaO in PBS [M]	pH
$1 \times 10^{-2}$	12,6	$1 \times 10^{-2}$	12,3	$1 \times 10^{-2}$	12,3
$1 \times 10^{-3}$	11,7	$1 \times 10^{-3}$	7,8	$1 \times 10^{-3}$	10,2
$1 \times 10^{-4}$	10,7	$1 \times 10^{-4}$	7,5	$1 \times 10^{-4}$	7,5
$1 \times 10^{-5}$	10,0	$1 \times 10^{-5}$	7,5	$1 \times 10^{-5}$	7,4
$1 \times 10^{-6}$	8,8	$1 \times 10^{-6}$	7,5	$1 \times 10^{-6}$	7,4

#### 5.6.4 Einfluss von Protease auf das Virus

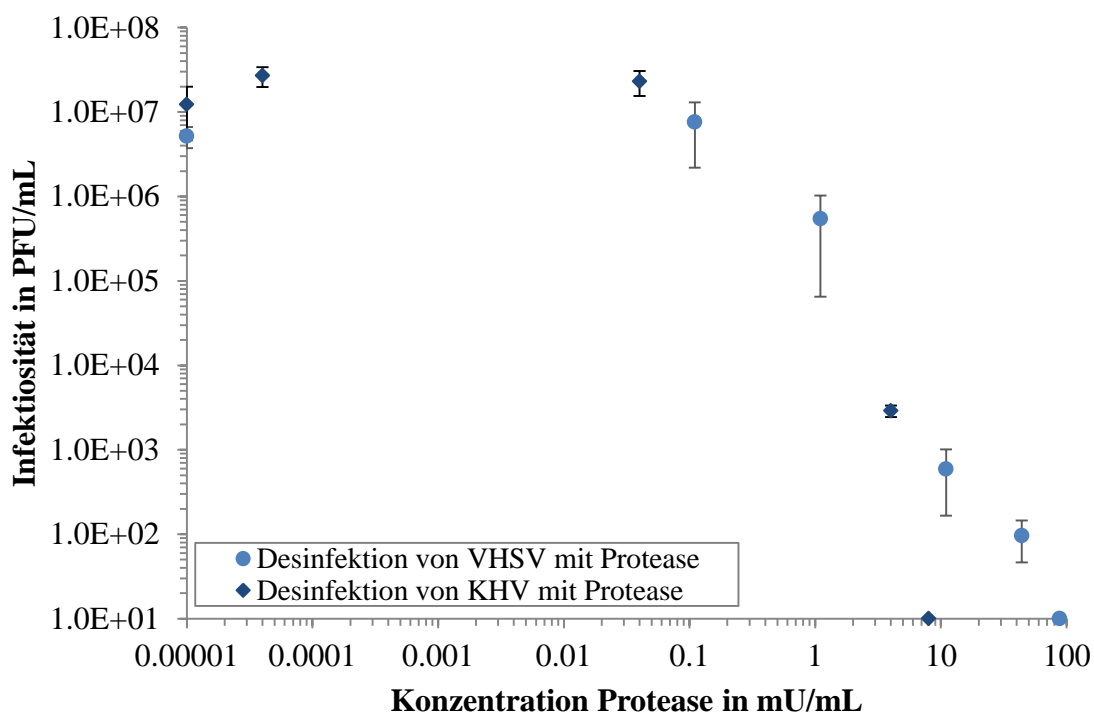


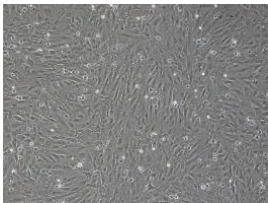
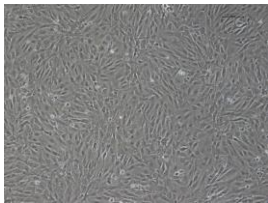
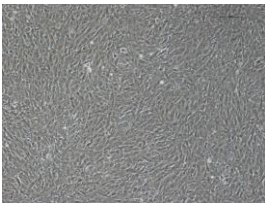
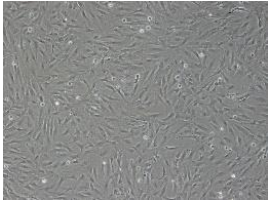
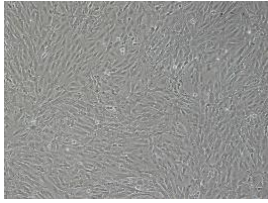
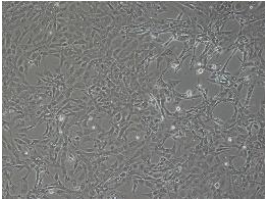
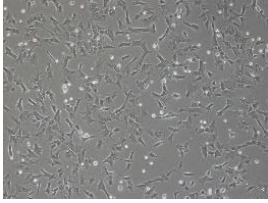
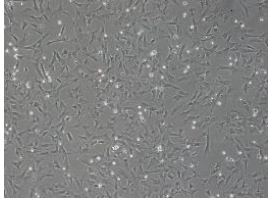
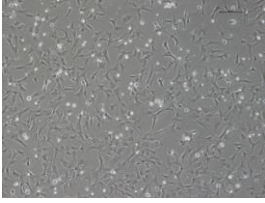
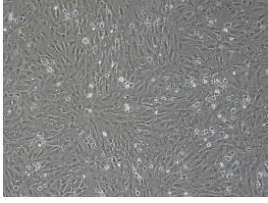
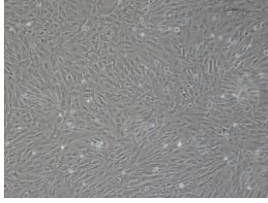
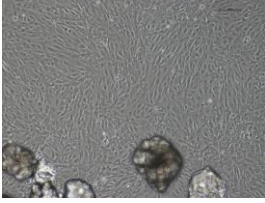
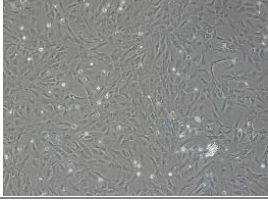
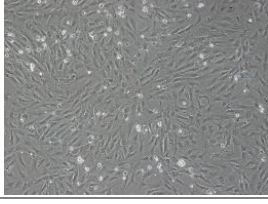
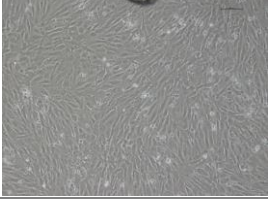
Abbildung 23: Desinfektion von KHV-TP30 in DMEM mit Neutrase® nach 24 h bei 8°C

Die Reduktion des VHSV um fünf Zehnerpotenzen erfolgt bei dem Einsatz von Protease einer Konzentration von 44 mU/mL. Das KHV zeigte eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber der Protease und war bei 8 mU/mL bereits vollständig inaktiviert (Abbildung 23).

### 5.7 Desinfektion von adsorbiertem KHV

Mit den ermittelten Konzentrationen der Desinfektionsmittel, die zu einer vollständigen Inaktivierung der Viren geführt haben, sollte abschließend die Wirkung auf an Quarzsand adsorbierte Viruspartikel untersucht werden. Auf den Abbildungen in Tabelle 16 sind beispielhaft Ausschnitte aus den untersuchten T-25-Zellkulturflaschen abgebildet.

Tabelle 16: Desinfektion von an Quarzsand adsorbiertem KHV

	1 d p.i.	2 d p.i.	4 d p.i.
<b>Negativkontrolle</b>			
<b>Positivkontrolle</b>			
<b>Neutrase®</b>			
<b>Branntkalk</b>			
<b>Peressigsäure</b>			

Die Negativkontrolle (Quarzsand, der in Medium ohne Virus inkubiert wurde) zeigte keine Auffälligkeiten. Die Zellen wuchsen in den T25-Zellkulturflaschen ohne negative Auswirkungen weiter. In der Positivkontrolle konnten am zweiten Tag nach der Zugabe des Sands zur Kultur an wenigen Stellen Zeichen des für das KHV typischen cytopathischen Effekts gefunden werden. Am vierten Tag nach der Infektion war die gesamte Zellkultur infiziert. Die Desinfektion mit Neutrase®, die nicht inaktiviert werden kann, führte zu einer Verschlechterung der Anhaftung der Zellen in den Kulturflaschen. An keinem der beobachteten Tage wurden Veränderungen festgestellt, die durch die Vermehrung von KHV ausgelöst werden. Die Desinfektionen mit Branntkalk und Peressigsäure konnten durch Neutralisation gestoppt werden. Dies hatte zur Folge, dass die Zellkultur keine nachteiligen Auswirkungen bei Zugabe des desinfizierten Sands erfuhr. Weder in der Nä-



he des eingebrachten Quarzsands noch an anderen Positionen in der Kulturflasche konnten während der Inkubationszeit Anzeichen für die Vermehrung von KHV gefunden werden.

## 6 Diskussion

In der Literatur sind Daten zur Desinfektion der beiden Viren KHV und VHSV beschrieben, die streng genommen nicht der Definition genügen, weil die eingesetzten Virustiter zu niedrig gewählt wurden. Aus diesem Grund und um Desinfektionsmittel *in vitro* zu untersuchen, die auch zur Desinfektion in ökologisch wirtschaftenden Betrieben zugelassen sind, musste im ersten Teil der Arbeit eine ausreichende Replikation der Viren in den Zellkulturen sichergestellt werden.

### 6.1 *In vitro* Replikation der Viren

Zur besseren Untergliederung werden die Zellkulturexperimente und Infektionscharakterisierungen in Folge für die beiden Viren KHV und VHSV getrennt diskutiert.

#### 6.1.1 Charakterisierung der RTF-Zellen zur Produktion von VHSV

Die am LGL etablierten Methoden und Arbeiten zur Replikation konnten für die Arbeiten am BVT übernommen werden, da dort sowohl der Umgang mit den Zellen etabliert ist als auch die Virusproduktion in diesem System erfolgreich durchgeführt werden konnte. Wegen Abweichungen in der Kultivierungstemperatur und dem Wechsel auf Medien, die am BVT eingesetzt werden, sollte das Verhalten der Zellen überprüft werden. Die Zellen proliferieren, wie bei der für diese Zelllinie relativ hohen Temperatur von 20°C erwartet werden konnte, mit einer Populationsverdopplungszeit von 79 h langsam im Vergleich zu der CCB-Zelllinie bei 25°C (Abbildung 9). Aus diesem Grund und wegen der maximalen Zelldichte im Monolayer von über 300.000 Zellen/cm<sup>2</sup> werden für Infektionsversuche und Endverdünnungsbestimmungen höhere Flächenzellichten von 80.000 Zellen/cm<sup>2</sup> zum Kulturbeginn eingesetzt. Die Virustiter ergeben sich bei diesen Parametern zu über 1 x 10<sup>9</sup> PFU/mL, die ausreichen, um Desinfektionsmethoden zu realisieren.

#### 6.1.2 Charakterisierung der CCB-Zellen zur Produktion von KHV

Die 1999 in Hannover aus dem Karpfenhirn isolierten Zellen wurden ursprünglich in EMEM mit einem hohen Anteil Glucose und FKS isoliert. Durch den Selektionsdruck haben sich die Zellen an diese Medienkomposition adaptiert. Das im Haus verwendete MEM wurde daher zusätzlich mit nicht-essentiellen Aminosäuren versetzt. Daneben wurde auch DMEM mit dem gleichen Glucosegehalt von 4,5 g/L, wie das ursprüngliche EMEM verwendet. Weil das Wachstum bei sonst gleichen Bedingungen in DMEM niedriger war, wurde es nicht zur Replikation heran gezogen. Die Zellen bleiben aber auch in diesem Medium empfänglich für das Virus, wodurch es sich sehr gut eignet, um Versuche in sehr kleinem Maßstab bei CO<sub>2</sub>-Konzentrationen < 0,04 % zu realisieren. Bei der auf Abbildung 8 dargestellten Wachstumskurve handelt es sich um die Zellen in MEM bei 25°C und 5 % CO<sub>2</sub>, die bei den gleichen Kulturbedingungen für alle weiteren Optimierungsschritte herangezogen wurden. So lässt sich einerseits der MOI bestimmen, in dem die durch das Wachstumsverhalten berechnete Zellzahl zum Zeitpunkt der Infektion durch in Endverdünnungsmethoden ausgewertete Infektiositäten im eingesetzten Virusstock geteilt werden. Die Einstellung des TOI, der Zellzahl zum Zeitpunkt der Infektion wird ebenfalls dem Wachstumsverhalten entnommen. Die Bestimmung der maximalen Zelldichte auf

160.000 Zellen/cm<sup>2</sup> wird zur Interpretation der Optimierungsversuche benötigt, da im Batchbetrieb bei dieser Zelldichte eine Platzinhibierung Auswirkungen auf die Proliferation der Kultur hat.

Die Isolation von Viren aus erkrankten Fischen zeigte in dieser Zelllinie bei 20°C nach fünf Tagen synzytienartige, riesenhafte Zellen (Neukirch *et. al.* 1999). Dieselben Strukturen können mit dem verwendeten Isolat KHV-TP30 bei 25°C bereits drei Tage nach Infektion beobachtet werden (Abbildung 10). In Tabelle 2 sind Virustiter in CCB-Zellen aus gängigen Literaturstellen zusammengefasst. Sie haben gemein, dass auf Grund von qualitativen Bewertungen des CPE die Ernte des Virus aus der Zellkultur erfolgte. Bei einem Infektionsverlauf wurden schon zuvor die Einflüsse der Kulturzeit auf die Infektiosität, wie in Abbildung 10 gezeigt, jedoch keine Folgerungen auf die Produktion des Virus geschlossen (Fuchs *et al.* 2011, Lin *et al.* 2013). Die quantitative Auswertung der Infektiosität mittels Endverdünnungsbestimmung weist in allen Fällen nach wenigen Kulturtagen ein Maximum auf, die im weiteren Verlauf wieder stagniert. Die Infektiosität lässt sich folglich nicht mit dem Auftreten des CPE in Zellen korrelieren. Eine optische Bestimmung des Erntezeitpunkts ist folglich nicht möglich. In den meisten Literaturstellen wird sogar unabhängig von einer optischen Beurteilung des fortgeschrittenen CPE, beispielsweise nach 14 Tagen die Kultur abgebrochen und das Virus im Überstand als Virusstock verwendet. Einerseits nimmt man damit in Kauf, nicht die maximale Ausbeute des Virus zu erhalten. Andererseits ist die Gefahr bei diesem Vorgehen groß, durch mehrmaliges Passagieren solch eines Virusstocks nicht infektiöse oder nicht vollwertige Viren zu erhalten (Krell 1996). Unterstützt wird diese These durch die konstant hoch bleibenden Virus-DNA Mengen während der Replikation. Bei allen Stabilitätsuntersuchungen war keine Reduktion des DNA-Gehalts trotz abnehmender Infektiosität aufgetreten (siehe 5.5.1). Um diesen Effekt zu vermeiden, wurden daher alle Virusstocks in den Versuchen zum Zeitpunkt ihrer maximalen Infektiosität gewählt.

### 6.1.3 Infektionsoptimierung des KHV-TP30

Durch die vorhergegangenen Passagen der Virusstocks zum richtigen Erntezeitpunkt, konnten bereits Virustiter von  $3 \times 10^9$  PFU/mL realisiert werden. Ausgehend von diesem Virusstock wurden Optimierungsarbeiten durch Variation der verfahrenstechnischen Größen MOI und TOI durchgeführt. Der Einfluss des MOI auf die Maximierung der Infektiosität des Virus ist gering. Die Erhöhung des Titers konnte bei dem idealen MOI von 0,05 auf  $1 \times 10^8$  PFU/mL gegenüber den anderen MOI mit Virustitern zwischen  $3 \times 10^7$  –  $6 \times 10^7$  PFU/mL verdoppelt werden. Mit dem Ziel eine große Menge Virus zu replizieren, sollte ein niedrigerer MOI gewählt werden, um die Ausbeute zu erhöhen. Mit einem MOI von 0,0004 kann ausgehend von 200 PFU/mL ein Titer von  $2 \times 10^7$  PFU/mL realisiert werden, das einer Vervielfachung des Virus um den Faktor 100.000 entspricht. Rücksicht muss hierbei auf die Wahl des TOH genommen werden. Bei kleineren MOI als 0,05 steigt die benötigte Zeit, bis die höchstmöglichen Infektiositäten erzielt werden. Gegenüber zwei Tagen nach der Infektion bei höheren MOI, steigt der TOH bei 0,0004 auf vier Tage.

Erklären lassen sich die Ergebnisse mit der Annahme, dass eine Zelle in der Lage ist, eine maximale Anzahl an Viren zu produzieren, bevor sie abstirbt. Bei hohen MOI werden alle Zellen umgehend infiziert und replizieren fortan Virus ohne sich weiter zu teilen, da ihnen wegen der Proteinbiosynthese des Virus die Energie zur Zellteilung fehlt. Bei niedrigen MOI gibt es Populationen, die infiziert sind und Virus replizieren, während sich eine zweite Population weiterhin teilt. Durch Sekundärinfektionen werden nach und nach alle Zel-

len infiziert und replizieren Virus. Es gibt ein Optimum bei dem sowohl die spezifische als auch die volumetrische Virusproduktion am größten sind (Maranga *et al.* 2003).

Durch Erhöhung des TOI konnte die Zelldichte in einer Kultur und damit die volumenbezogene Virusreplikation erhöht werden. Bei niedrigen TOI und niedrigen MOI wurde eine geringere Virusproduktion beobachtet. Erklären lässt sich dies einerseits durch ein geringeres Zellwachstum bei niedriger Zelldichte wegen mangelnden Zellkontakts. Bei zu hoch gewählten TOI und niedrigen MOI konnte durch Platzinhibierung kein Zellwachstum mehr stattfinden. Die Zellen könnten darüber hinaus eine geringere spezifische Virusreplikation aufweisen, wenn sie durch die Umstellung ihres Stoffwechsels auf hohe Zelldichten reagieren. Eine weitere Erklärung wäre der hohe Nährstoffbedarf einer dichten Kultur. Der Mangel eines essentiellen Nährstoffs könnte ebenfalls zu einer geringeren Virusreplikation beitragen.

## 6.2 Beschaffenheit der untersuchten Teichböden

Für die Fruchtbarkeiten ist neben der Bodenart und dem pH-Wert auch der Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor von großer Bedeutung. Dieser ist in den oberpfälzischen Teichen deutlich niedriger als in den fränkischen Teichen. Wenn man die Ergebnisse für den Oberboden und den Unterboden in Tabelle 13 vergleicht, so zeigt sich, dass bezüglich des pflanzenverfügbaren Phosphors ein geogener Einfluss vorhanden ist. Bezüglich des Phosphors gibt es jedoch noch eine Reihe von weiteren Faktoren. Eine Anreicherung ist durch Düngemaßnahmen, durch die Einleitung von nährstoffreichen Zuläufen aus Kläranlagen, durch Silosickerwässer, Drainagen und Abschwemmungen aus der Landwirtschaft möglich.

In vorliegender Arbeit wurde versucht, die überwiegende Nutzung rings um die Teiche zu erfassen. Sie wurde eingeteilt in Wald (W), Grünland (G), Ackerland (A) bzw. aus einer Kombination aus den verschiedenen Nutzungen. Dabei wurden 71 von 86 Teichen zugeordnet. Einige Teiche ließen sich nicht zuordnen. Die Zuläufe von 3 Teichen befanden sich beispielsweise in der Nähe zu einer Kläranlage. Bei der statistischen Auswertung aller dargestellten Nutzungen ergaben sich nur tendenzielle Unterschiede. Bei einem Mittelwertsvergleich der Teiche, die ausschließlich von Wald und ausschließlich von Ackerland umgeben waren, war der Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor in den Teichen mit umliegenden Ackerland ( $n=11$ ) mit 27 mg/100 g Boden trocken signifikant höher als bei Teichen, die ausschließlich von Wald umgeben waren ( $n=23$ ) mit 18 mg/100 g Boden trocken. Die drei Teiche, die sich im Einflussbereich einer Kläranlage befanden, hatten einen mit durchschnittlich 63 mg/100 g deutlich höheren Gehalt an  $P_2O_5$  im Teichboden als die anderen Teiche (Abbildung 24).

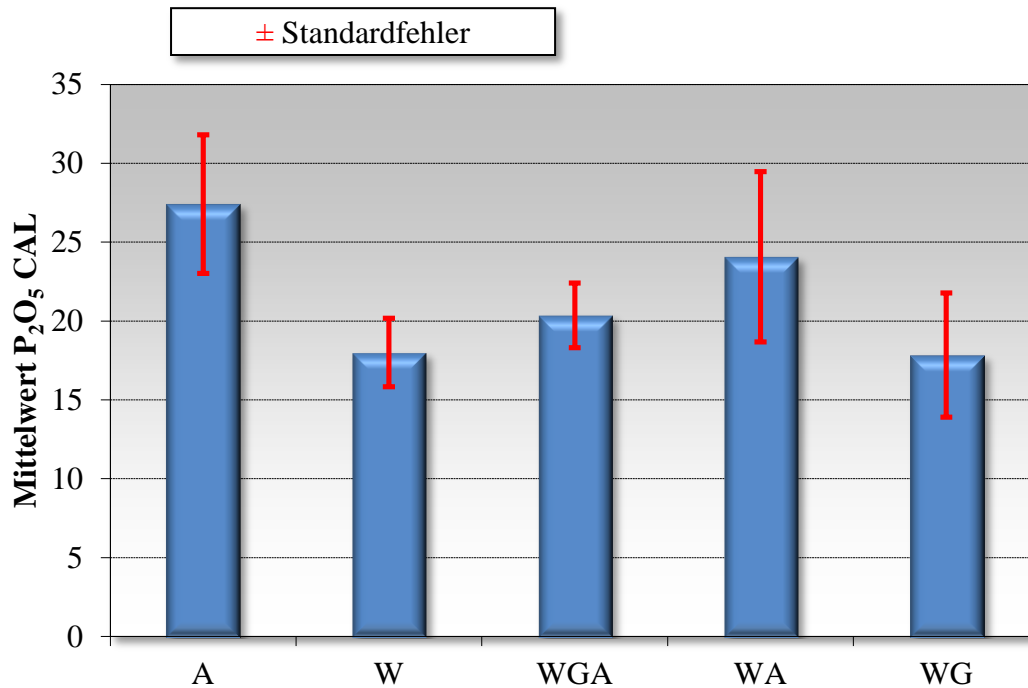


Abbildung 24: Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor in mg/100 g Bayerische Teichböden unterschieden nach der umgebenden Nutzung (Wald (W), Grünland (G), Ackerland (A) bzw. Kombination aus den verschiedenen Nutzungen)

In Bayern geben nach einer Studie (Oberle *et al.*, 2014) 71 % der Betriebe an, dass ihre Teiche überwiegend Himmelsteiche sind, in Teichketten liegen und über keinen ständigen Wasserzulauf verfügen. In einer weiteren Auswertung wurde betrachtet, ob Teichböden, die unten in einer Teichkette liegen, einen höheren Gehalt an  $P_2O_5$  aufweisen als Teiche die oben bzw. in der Mitte der Teichkette liegen. Dabei zeigte sich, dass Teiche die unten in einer Teichkette ( $n=16$ ) liegen tendenziell mit 30 mg/100 g einen höheren  $P_2O_5$ -Gehalt aufweisen als Teiche, die in der Mitte ( $n=28$ ; 21 mg) oder oben ( $n=34$ ; 21 mg) in einer Teichkette liegen. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 25 dargestellt.

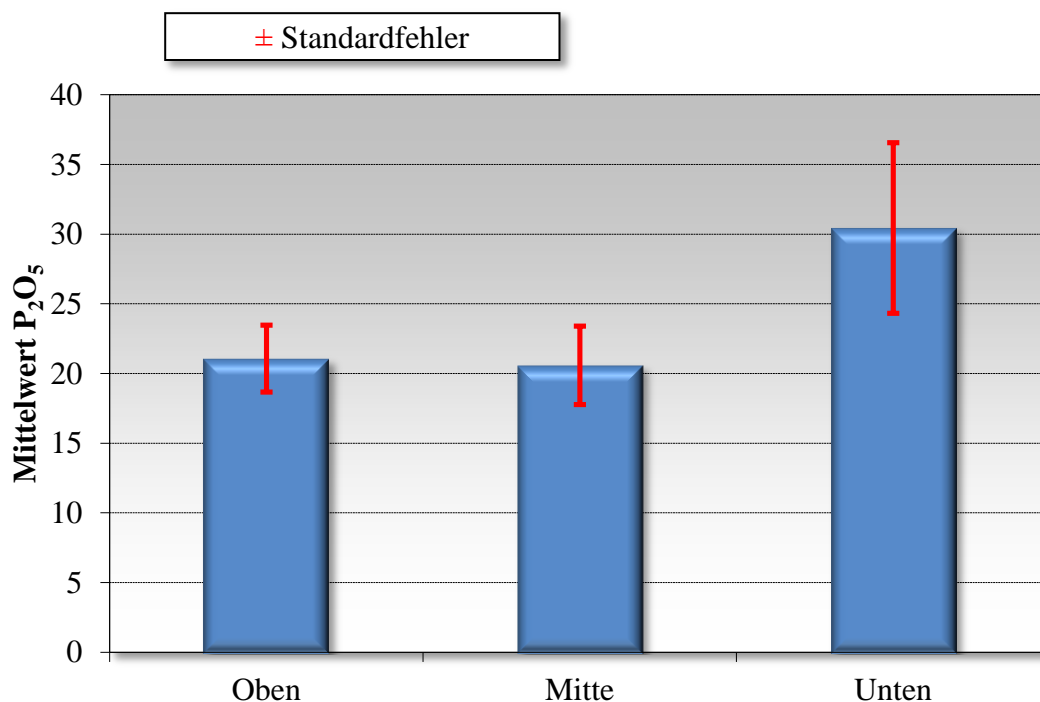


Abbildung 25: Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> CAL) von Teichböden in Abhängigkeit von der Lage in einer Teichkette

Zur Desinfektion von Teichböden ist die Kenntnis der Zusammensetzung von Teichböden von großer Bedeutung. In erster Linie spielen hier die Kationenaustauschkapazität, die Korngrößenzusammensetzung, der Humusgehalt und auch der pH-Wert der Teichböden eine Rolle. Die Untersuchung soll die unterschiedliche Bodenbeschaffenheit der Teichböden aufzeigen und so bei künftigen Untersuchungen die Beurteilung der vorgefundenen Qualitäten ermöglichen. In vielen Parametern ergaben sich große Unterschiede. Es zeigt sich, dass die Unterschiede auch deutlich vom Untergrund geprägt sind. Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich die Bodenqualitäten der fränkischen mit den oberpfälzischen Teichböden in den Parametern Kationenaustauschkapazität, pH-Wert und Magnesiumgehalt signifikant unterscheiden und in den Parametern Organische Substanz, Gehalt an pflanzenverfügbarem Phosphor und dem Calciumgehalt teilweise signifikante und zumindest tendenzielle Unterschiede vorhanden waren. Wie auch aus den Untersuchungen der Unterböden hervorgeht, wirkt sich die Beschaffenheit des Unterbodens deutlich auf die Schlammqualität aus. Die vorgefundenen Unterschiede lassen sich auch erklären bei Eintrag der Probestellen auf einer geologischen Karte (Abbildung 26).

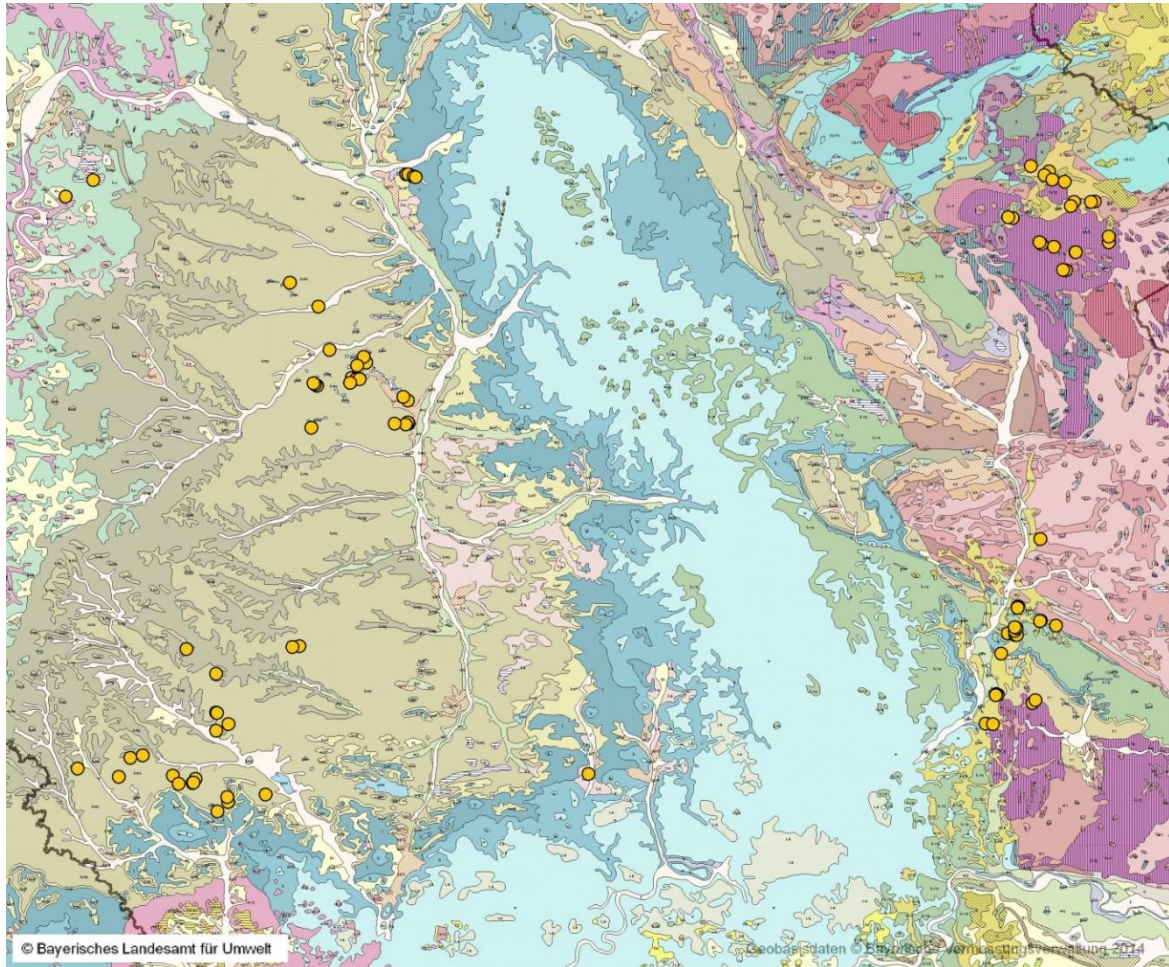


Abbildung 26: Lage der Entnahmeorte auf unterschiedlichem geologischem Ausgangsgestein

Ausgangsgestein des Bodens in der fränkischen Teichwirtschaft ist der Sandsteinkeuper, Gipskeuper und Buntsandstein und gehört zum fränkischen Schichtstufenland, während das Ausgangsgestein der Oberpfälzer Teiche aus Urgesteinsverwitterungsböden besteht, welches sich aus den Grundgebirgen bildet. Bekannt sind im Burgsandstein Kalkeinlagerungen, sog. „Dolomitarkosen“. Der Sandstein ist daher kalkhaltig. Dies macht sich auch bei der Betrachtung der Calciumgehalte der Teichböden bemerkbar. Unterschiedliche pH-Werte, unterschiedliche Tongehalte und unterschiedliche Kationenaustauschkapazität sind durch die unterschiedlichen geologischen Voraussetzungen begründet. Stellt man den Tongehalt und die Kationenaustauschkapazität aller beprobten Teichböden gegenüber, so ergibt sich ein deutlicher Zusammenhang. In Abbildung 27 ist der Zusammenhang dargestellt.



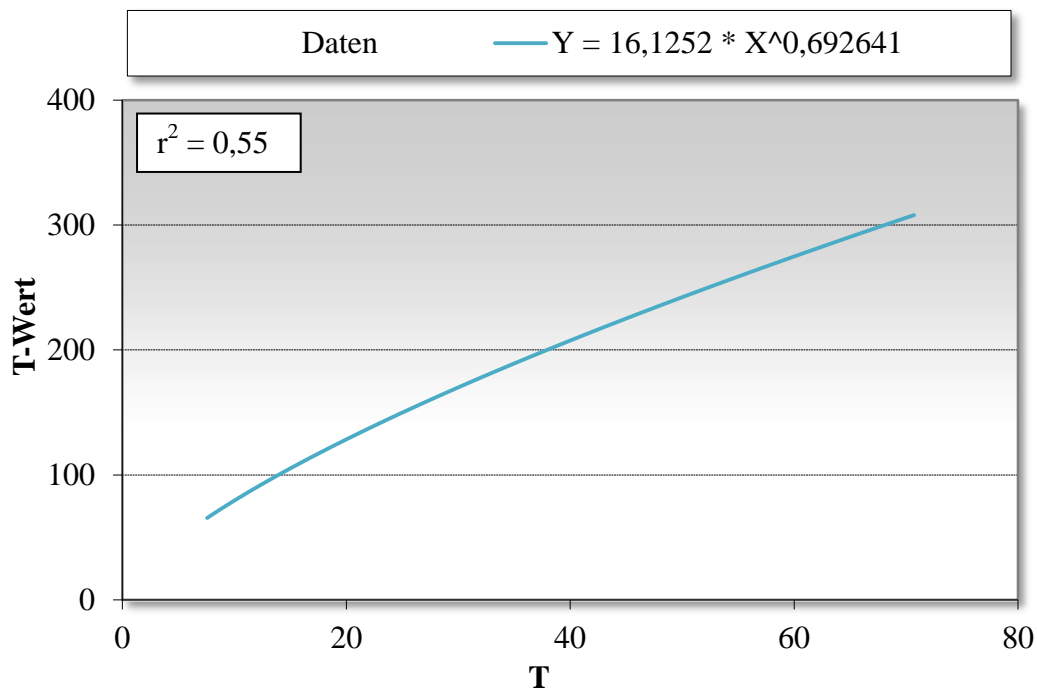


Abbildung 27: Abhängigkeit zwischen Tongehalt und Kationenaustauschkapazität der untersuchten Teiche

Der Gehalt an organischer Substanz kann die Virusbindung beeinflussen. Für den Laien erscheinen die organischen Gehalten im Schlamm mit durchschnittlich 8,8 % Tongehalt niedrig. Vergleicht man den Gehalt mit anderen Böden, so zeigt sich dass der Teichboden nach Scheffer und Schachtschabel (1960) deutlich über dem Humusgehalt von Ackerböden (1-3%) und von Wiesenböden bewegt und im Durchschnitt mit 8,8 % als stark humos und bei den gemessenen Werten über 15 % bereits als anmoorig zu bezeichnen ist. Organische Substanz und Mineralböden haben eine sehr unterschiedliche Lagerungsdichte. Die Lagerungsdichte variiert in Mineralböden zwischen 1,1 und 1,8 g/cm<sup>3</sup> und bei organischen Böden zwischen 0,12 und 0,48 g/cm<sup>3</sup>. (Hintermaier-Erhard und Zech 1997; Schroeder 1992).

Bei einem durchschnittlichen Gehalt der organischen Substanz von 8,8 % der T ist der Volumenanteil im feuchten Boden um ein mehrfaches höher. Eine Reduktion von Schlammschichten durch Belüftung ist daher auch bei Gehalten von 8,8 % des Tongehalts durchaus sinnvoll. Die Humusgehalte in Franken sind teilweise signifikant niedriger als in der Oberpfalz. Dies ist in sich schlüssig, da die Zersetzung organischer Substanz bei höheren pH-Werten schneller erfolgt als bei niedrigeren pH-Werten (Scheffer und Schachtschabel 1960). Die Teichregionen unterscheiden sich im Gehalt an organischer Substanz und in der Kationenaustauschkapazität. Bei höherer Kationenaustauschkapazität liegt ein niedrigerer Gehalt an organischer Substanz vor. Bei niedriger Kationenaustauschkapazität ist ein höherer Gehalt an organischer Substanz vorhanden. Da beides, die Kationenaustauschkapazität als auch der Gehalt an organischer Substanz, Virusmaterial adsorbieren kann, kann die Frage bezüglich Unterschieden in der Virusadsorption zwischen den Teichgebieten nicht eindeutig beantwortet werden. In den eigenen Versuchen konnte kein Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf die Adsorption des KHV gezeigt werden.

### 6.3 Adsorptionsversuche mit KHV

Aus den Adsorptionsisothermen in Abbildung 15 und Abbildung 29, die sich an allen Materialien nach Freundlich verhalten und eine lineare Korrelation darstellen, lassen sich keine Einflüsse der Hydrophobizität oder der Ionenstärke erschließen. Die Vermutung, dass das Virus durch seine Proteinhülle mit der funktionalen Oberfläche in unterschiedliche Wechselwirkungen tritt, konnte nicht nachvollzogen werden. Eine Möglichkeit wäre das zu große Verhältnis von Oberfläche zu Viruspartikel, die durch die kleinen Korngrößen ( $< 300 \mu\text{m}$ ) und hohe Porosität der Materialien zustande kommen. Weiterhin könnte die komplexe Zusammensetzung des Zellkulturmediums dafür verantwortlich zeigen, dass mögliche ionische Interaktionen zwischen dem Hüllprotein des Virus und den unterschiedlich geladenen Oberflächen des Quarzsands, der Bodenprobe und des mit Aminen modifizierten SPE-Materials, blockiert werden. Zweiwertige Kationen, die im Medium enthalten sind, könnten Bindungen zwischen zwei geladenen Molekülen ermöglichen. Das zu 10 % im Medium enthaltene FKS kann Proteininteraktionen bedingen, die in einer Änderung der Ladung auf der Virusoberfläche resultieren.

Es konnte durch die Auswertung mittels Endverdünnungsmethode mit an Quarzsand und Bodenproben adsorbierten Materials gezeigt werden, dass die Viren im Sediment grundsätzlich infektiös blieben. Durch Verdünnen mittels Waschschritten, stellte sich bei jeder Wiederholung ein Gleichgewicht ein, das auf eine reversible Bindung hindeutete. Insbesondere bei dem ersten und zweiten Waschschriff verblieben höhere Infektiositäten im Überstand als durch eine Verdünnung um 1:10 erwartet worden wären (Abbildung 16). Da Adsorption und Desorption im Gleichgewicht stehen, kann der Einfluss von adsorbiertem Virus und in den Poren gelöst vorliegendem Virus nicht isoliert betrachtet werden. Für eine Aussage über den Erfolg von Desinfektionsmaßnahmen muss die gesamte Bodenprobe mit Restfeuchte betrachtet werden.

### 6.4 Stabilität gegenüber äußerer Einflüsse

#### Einfluss des Mediums

Im Kühlschrank gelagert wies der Virusstock im Kulturmedium MEM keine hohe Stabilität auf, weil Luftsauerstoff durch Kunststoffgefäße diffundieren kann und den pH des  $\text{CO}_2$ -gepufferten MEM auf einen Wert um pH 10 steigen lässt. Innerhalb von 12 Tagen sank die Infektiosität um eine Zehnerpotenz; danach fiel sie wegen des pH-Werts erwartungsgemäß noch schneller. Bei höheren Temperaturen, wie den Kultivierungsbedingungen von  $25^\circ\text{C}$  zeigte der Virustiter bereits während der Replikation eine Abnahme, weshalb das MEM bei Raumtemperatur als Lagermedium ausgeschlossen werden konnte.

Das DMEM wurde als Lagermedium gewählt, weil es im Haus mit niedrigen Konzentrationen an Natriumcarbonat und 25 mM HEPES unter Atmosphärenbedingungen gepuffert bei pH 7,4 eingesetzt wird. Hier zeigte sich bei Kulturbedingungen von  $25^\circ\text{C}$  ebenfalls eine Reduktion der Infektiosität innerhalb von vier Tagen um eine Zehnerpotenz beim KHV (Abbildung 17). Das VHSV, das bei  $20^\circ\text{C}$  repliziert wurde, wies eine höhere Stabilität auf und konnte erst nach 14 Tagen um eine Zehnerpotenz reduziert werden (Abbildung 18). Beide Virussuspensionen wiesen eine deutliche Stabilitätssteigerung bei  $8^\circ\text{C}$  in DMEM auf, die sich dazu eignet, Versuche innerhalb weniger Tage mit dem gleichen Isolat durchzuführen, da eine Reduktion der Infektiosität um eine Zehnerpotenz erst nach mindestens 28 Tagen eintrat. Dabei sollte eine Verdünnung mit frischem Medium von mindestens einer Zehnerpotenz erfolgen, um Proteasen aus der Zellkultur zu reduzieren.

Alternativ bleibt das Aliquotieren in geringeren Mengen und Einfrieren bei  $-80^\circ\text{C}$ .



### pH-Wert

Die Angaben aus der Literatur, wonach das KHV unter pH 3 und oberhalb pH 11 nicht länger als 2 Stunden stabil sei, konnten bestätigt und ergänzt werden (Neukirch 2003). Durch Einstellen des pH mit Salzsäure, respektive Natronlauge in sterilem Zellkulturmedium und einer Einwirkdauer von 24 Stunden bei 8°C ergab sich eine vollständige Inaktivierung bereits bei einem unteren pH von 4,5 und eine Reduktion um mehr als drei Zehnerpotenzen bei pH 10,5 (Abbildung 20).

Das VHSV zeigt nach Literaturangaben eine größere Resistenz gegenüber extremen pH Werten und soll bei pH 2,5 etwa 10 min und bei pH 12 sogar 2 h stabil bleiben (Licek 2011). Da im Versuch (Abbildung 20) nur der Einfluss des pH-Werts nach 24 h bei 8°C gemessen wurde, können keine kinetischen Aussagen getroffen werden. Das Resultat einer vollständigen Inaktivierung des VHSV nach der gewählten Verweilzeit ist vergleichbar mit der Stabilität von KHV.

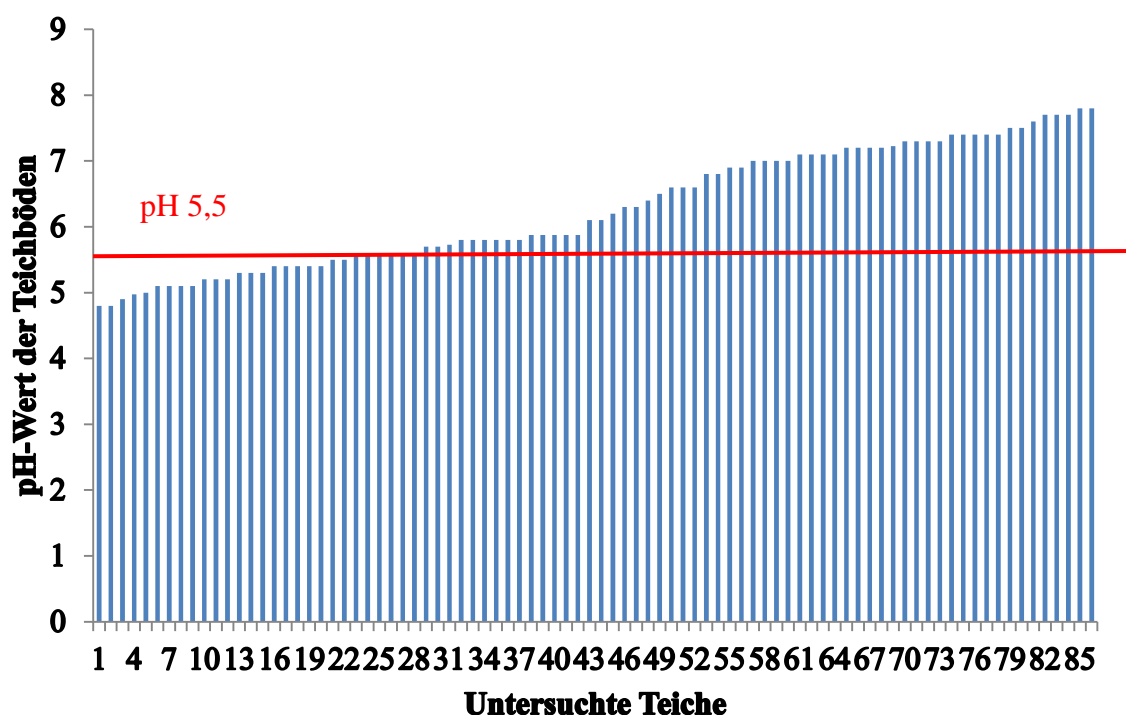


Abbildung 28: Gemessene pH-Werte in den untersuchten Teichen

In einem Viertel der untersuchten Teiche liegt der pH unter 5,5 und in knapp der Hälfte unter pH 6 (Abbildung 28). Da unterschiedliche Verweilzeiten der Virussuspensionen bei diesen pH-Werten nicht untersucht worden sind, lassen sich keine definitiven Aussagen zur Inaktivierung treffen.

### UV-Strahlung

Der Einfluss der UV-Strahlung konnte im Labor nicht reproduzierbar untersucht werden. Eine Aussage zum Einfluss von UV-Licht auf die Tenazität des KHV lässt sich allerdings der Literatur entnehmen, sofern das Virus in Flüssigkeit vorliegt. Eine Bestrahlung mit  $81 \text{ mW/cm}^2$  bei einer Wellenlänge von 260 nm reicht aus, um bei einer Schichtdicke des Überstands von 2,5 mm den Virustiter um den Faktor 1000 zu reduzieren (Perelberg *et al.* 2005). Dies ist nur theoretisch denkbar, da die UV-Strahlung durch Abschirmung nicht in Sedimentschichten oder Wassertiefen ab mehreren Millimetern wirken kann. Zudem wird

für Desinfektionszwecke in der Literatur wie im obigen Beispiel UV-C-Strahlung mit Wellenlängen von 100 - 280 nm, eingesetzt. Diese Anteile werden im Sonnenlicht beinahe vollständig durch die Atmosphäre und das Ozon herausgefiltert, so dass keine messbaren Lichtdosen auf der Erdoberfläche auftreffen. Eine Inaktivierung der Viren auf Grund von UV-Strahlung spielt folglich eine untergeordnete Rolle, während die auftreffende Wärmestrahlung zu einer Inaktivierung beitragen wird.

### Temperatur

Neben den untersuchten Temperaturen zur Lagerstabilität konnten Werte zum Einfluss der Temperatur auf die Inaktivierung des KHV der Literatur entnommen werden. In steriler Umgebung in Zellkulturüberstand konnte das Virus ab einer Temperatur von 50°C innerhalb einer Minute inaktiviert werden (Kasai et al. 2005). Bei einer Temperatur von 35°C werden zwei Tage zur Inaktivierung angegeben (Neukirch 2003). In natürlicher Umgebung wird dieser Prozess bedingt durch die Kombination mehrerer Einflüsse beschleunigt sein. In Versuchen mit Zellkulturüberstand in sterilem Medium verdünnt, deuten temperaturabhängige Einflüsse darauf hin, dass das Virus durch Oxidation oder Interaktion mit anderen Proteinen, bspw. Proteasen eine Änderung der Hüllproteine erfahren könnte.

Die Tenazität des VHSV in Abhängigkeit der Temperatur wurde im Zwischenbericht und einer Veröffentlichung in Form eines Posters in Starnberg vorgestellt. Bei Temperaturen ab 20°C konnte eine Inaktivierung ausgehend von mindestens  $1 \times 10^8$  PFU/mL vollständig in 7 Tagen und bei 28°C bereits nach einem Tag beobachtet werden. Die untersuchten Einflüsse unterschiedlicher Temperaturen auf die Infektiosität lassen sich eingeschränkt für Inaktivierungsprozesse von VHSV oder KHV in einem Teich nutzen, weil im Teich noch weitere Prozesse ablaufen. Nach publizierten Daten (PIK-Potsdam) konnten im August 2014 bei Böden in 10 cm Tiefe noch Temperaturen über 28°C gemessen werden. Da diese Temperaturen nur tagsüber erreicht werden können, würde die Inaktivierung bezogen auf eigene Versuche mehrere Tage in Anspruch nehmen. Durch einen hohen Humusgehalt im Teichboden wird die Erwärmung durch Sonneneinstrahlung höher als in den untersuchten Böden sein, was sich wiederum positiv auf die Inaktivierung auswirkt.

Bei sehr niedrigen Temperaturen, wie sie im Winter vorliegen, werden alle inaktivierenden Prozesse, sei es die Oxidation, die Hydrolyse oder die Denaturierung um ein Vielfaches langsamer geschehen. Da auch Frostzyklen nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Aktivität eines Virus besitzen (Abbildung 19), müssten zur Desinfektion im Winter inaktivierende Reagenzien eingebracht werden, die eine lange Verweil- und Halbwertszeit besitzen.

## 6.5 Inaktivierung des Virus mit zugelassenen Desinfektionsmitteln

KHV und VHS gehören zu den behüllten Viren, die sich dadurch auszeichnen, dass sie Teile der Zellmembran ihrer Wirte nutzen, um sich und ihre DNA vor der Umgebung zu schützen. Neben der Lipiddoppelmanbran der Wirtszelle werden weiterhin viruseigene Proteine darin eingebaut. Diese dienen zur besseren Infektion durch wirtsspezifische Rezeptoren und zur Unterdrückung der Immunantwort im Wirtsorganismus. Aus diesem Grund führt die Denaturierung, Modifizierung oder der Verdau von Hüllproteinen zu einer Inaktivierung der Viren. Dieser Mechanismus ist auch für die Wirkung der hier untersuchten Desinfektionsmittel verantwortlich.

### Peressigsäure

Peressigsäure dissoziiert in Wasser gelöst zu Essigsäure und Wasserstoffperoxid. Dadurch ergibt sich eine kombinierte Wirkung durch die Reduktion des pH und der Säuredissoziation. Zum anderen ergibt sich eine oxidative Wirkung des Wasserstoffperoxids, das allmählich bereitgestellt wird und wiederum eine Quelle für Sauerstoffradikale darstellt. Die notwendigen 0,1 Vol.-% zur Inaktivierung beider Viren kann auf die Reduktion des pH-Werts zurückgeführt werden, zieht man die Ergebnisse der Stabilitätsversuche in 5.5.3 heran. Bei dieser Konzentration an PES werden im Zellkulturmedium pH-Werte von pH 4,3 erreicht. Ein additiver Effekt von Wasserstoffperoxid und pH-Veränderung durch die Peressigsäure konnte zwar nicht nachvollzogen werden, ist aber dennoch nicht auszuschließen. Formulierungen der Peressigsäure wie Wofasteril E400® oder anderer Hersteller könnten von den untersuchten Ergebnissen leicht abweichen, da Unterschiede im Gleichgewicht zwischen Essigsäure, Wasserstoffperoxid und der Peressigsäure vorliegen können.

Wasserstoffperoxid weist etwa das halbe Molekulargewicht der PES auf. In den Vergleichsversuchen (5.6.2) waren ebenfalls 0,1 Vol.-% Wasserstoffperoxid notwendig, um die Viren zu inaktivieren. Dies entspricht der doppelten Stoffmenge, die durch PES bereitgestellt werden kann. Als Beleg, dass hier oxidative Prozesse verantwortlich sein müssen, kann der stabile pH in diesen Lösungen gesehen werden.

Bezogen auf die wirkenden Endkonzentrationen der PES in Zellkulturmedium mit pH 7,4 von 0,1 Vol.-% würden 3,97 L der Gebrauchslösung (39 %) zur Desinfektion von 1 m<sup>3</sup> benötigt. Nach dem Ablassen eines Teichs ist es notwendig, die Aufwandsmenge für zu desinfizierende Flächen anzugeben. Daher wird die Annahme getroffen, dass 10 cm Sediment desinfiziert werden sollen. Die mittlere Feuchte von entnommenen Sedimenten betrug 65 %, die für weitere Berechnungen herangezogen wird (5.3.1). Aus dieser Restfeuchte ergeben sich 65 L/m<sup>2</sup> Flüssigkeit im Sediment. Die hierfür benötigte Menge an PES liegt knapp über 1550 L/ha. Um diese Menge auszubringen, müssten dennoch Verdünnungen davon angesetzt werden, damit die gesamte Fläche mit mehr als 1 mm Flüssigkeitsspiegel bedeckt werden könnte. Die Anschaffungspreise von Wofasteril E-400® liegen bei 254,66 €/25 kg (entspricht 21,6 L Gebrauchslösung, Mitteilung Fa. Kesla, 2013), das zu einem Einsatzpreis von 18.300 €/ha führen würde.

Durch die erhobenen pH-Werte, die in 25 % der Teiche unter 5,5 betragen, ließen sich die aufzuwendenden PES-Mengen reduzieren, um die Sedimente anzusäuern. Die Endkonzentration von 0,1 Vol.-% wird für das Zellkulturmedium bei pH 7,4 benötigt. Je pH-Stufe die das Sediment saurer wäre, könnte auf Grund der Stöchiometrie ein Zehntel der PES ausreichen. Theoretisch würde für oben erwähnte Teiche ein Hundertstel der PES-Menge benötigt, was einen Einsatzpreis von 183 €/ha zur Folge hätte. Diese Aufwandsmengen müssten in der Praxis für die betreffenden Sedimente überprüft werden.

### Branntkalk

Die mit Branntkalk durchgeführten Desinfektionsversuche führten nur bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 mmol/L zu einer Desinfektion, weil hierbei der pH im gepufferten Medium auf einen pH > 12 erhöht werden konnte (Tabelle 15). Da in Abbildung 20 gezeigt wurde, dass das Virus im basischen pH-Bereich länger stabil bleibt, können die gewählten Konzentrationen unterhalb 10 mmol/L Branntkalk keine Desinfektion aufweisen. Die Wärmeerhöhung durch die exotherme Lösungsenthalpie von CaO spielt

keine Rolle bei der Desinfektion. Die Inaktivierung der Viren ist einzig auf die pH-Erhöhung zurück zu führen (Füllner 2014).

Mit den gleichen Annahmen, wie für PES als Desinfektionsmittel, dass 65 L/m<sup>2</sup> Flüssigkeit im Sediment vorliegen und dem Molekulargewicht von CaO ergeben sich 0,56 g/L bzw. 37 g/m<sup>2</sup>, die in Zellkulturmedium bei pH 7,4 aufgebracht werden müssten. Mit einem Preis von 18 €/dt (Mitteilung der Bayerischen Düngekalk GmbH, 2013) würde der Einsatz von 372 kg/ha einen Preis von 67 €/ha nach sich ziehen. Die empfohlenen Mengen von 1 kg/m<sup>2</sup>, respektive 10 t/ha nach Füllner (2014), die um das 30fache höher liegen, können durch die Höhe der pH-Werte in den Sedimenten sowie Annahme einer höheren Schlammdicke erklärt werden. Ausgehend von der Annahme, dass 1 mol CaO in Wasser zu 2 mol Hydroxidionen dissoziiert, würde für eine Änderung des pH-Wertes um eine Stufe, die fünffache Menge Branntkalks benötigt. Ausgehend von pH 5,4 läge eine desinfizierende Aufwandsmenge bei 9,3 t/ha und einem Einsatzpreis von 1674 €/ha.

### Protease

Die verwendete Protease, die unter dem Markennamen Neutrase® durch Novozymes vertrieben wird, besteht hauptsächlich aus einer Metalloendoprotease. Diese ist in der Lage innerhalb eines Proteins zu schneiden, wodurch auch Hüllproteine von Viren als Substrate in Frage kommen. Wegen der mangelnden Stabilität der Viren in sterilem Medium bei 8°C, lag die Vermutung nahe, dass zelluläre Proteasen ähnliche Eigenschaften aufweisen. Daneben war bereits bekannt, dass Mikroorganismen in der Lage sind, KHV in kürzester Zeit zu inaktivieren (Yoshida *et al.* 2013).

Durch die niedrige Aktivität von 0,8 U/g in dem verwendeten Produkt, würden zur Inaktivierung von hohen Virustitern in 1000 L sterilem Medium innerhalb von 24 h etwa 48 kg beim VHSV und 10 kg beim KHV des Produkts notwendig sein. Bezogen auf die Aufwandsmengen in 10 cm Sediment mit der mittleren Restfeuchte von 65 % würden von diesem Produkt 6,5 t/ha zur Desinfektion von KHV und 31 t/ha zur Desinfektion von VHSV benötigt. Solche Mengen an Protease wären im Teichwasser, in dem sowohl KHV als auch VHS in weniger als 72 h inaktiviert werden, kaum rentabel (Licek 2011). Eine Formulierung der Neutrase mit 500 U/mg (Shanghai Kayyon Biological Technology Co., Ltd) würde zu Aufwandsmengen von 10 g/ha für KHV und 50 g/ha für VHSV führen. Die erzielten Ergebnisse müssten zunächst mit der anderen Formulierung bestätigt werden. Weiterhin bleiben rechtliche Fragestellungen zur Ausbringung von Proteasen zu überprüfen.

Ungeachtet der Quelle der zu verwendeten Protease – auf Teiche ausgebracht oder durch Mikroorganismen sekretiert – wird der Nutzen bzw. die Wirkung stark temperaturabhängig sein. Ein zuverlässiger Einsatz im Winter bleibt folglich fragwürdig, auch wenn die Aktivität bei 8°C in den Versuchen ausgereicht hat, um KHV und VHSV zuverlässig zu inaktivieren.

## 7 Anwendung der Ergebnisse für die Praxis und Beratung

Die pH-Werte der Teichböden weisen große Unterschiede auf. Daher ist die Kenntnis wichtig bezüglich der Wahl des Desinfektionsmittels bzw. der Aufwandmenge. Die Messung des pH-Wertes vor einer Desinfektionsmaßnahme mittels eines Indikatorstreifens ist daher grundlegend. VHSV und KHV verlieren ihre Infektiosität zuverlässig bei pH-Werten unter 4,5 bzw. über 12. Die pH-Werte von Teichböden reichen von 4,8 bis 7,8. Der durchschnittliche pH-Wert der untersuchten Teichböden betrug 6,3.

Beträgt der pH-Wert von Teichen 7,4 so wird eine Menge von 372 kg/ha Branntkalk und etwa 1550 L Peressigsäure benötigt bei einer mittleren Trockenmasse des Bodens von 35 %. Je niedriger der pH-Wert des Teiches ist, desto mehr Branntkalk muss ausgebracht werden. Je pH-Einheit erhöht sich die auszubringende Branntkalkmenge um den Faktor 5. Die auszubringende Menge Peressigsäure zur pH-Absenkung ist bei niedrigeren pH-Werten geringer. Je pH-Einheit sinkt die auszubringende Menge um das 10-fache. Bei einem pH-Wert von 6,4 beträgt daher die notwendige Menge an Branntkalk 1860 kg/ha und 9300 kg/ha bei einem pH-Wert von 5,4. Die Kosten der Branntkalkgabe belaufen sich (18 €/dt) daher auf 67 €/ha bei pH 7,4, 335 €/ha bei pH 6,4 und 1674 €/ha bei pH 5,4. Bei sehr sauren pH-Werten im Teichboden ist eine Kalkung nicht zu empfehlen. Die Aufwandmengen zur Erzielung des notwendigen pH 12 werden sehr hoch und die hiermit verbundenen Kosten steigen stark.

Bei sehr sauren pH-Werten sollte statt einer Gabe von Branntkalk das Ausbringen von Peressigsäure zur Senkung des pH-Wertes erwogen werden. Die Aufwandmenge an Peressigsäure würde bei pH Wert von 7,4 etwa 1550 L/ha betragen. Die Anschaffungskosten des auf dem Markt zur Verfügung stehenden Wofasteril E-400© liegen bei 254,66 €/25 kg. (entspricht 21,6 l Gebrauchslösung, Mitteilung Fa. Kesla, 2013). Bei einem pH-Wert des Teichbodens von 7,4 müssten daher 18300 €/ha an Wofasteril ausgebracht werden, um den pH-Wert wirksam zu senken. Diese Aufwandsmenge reduziert sich pro Einheit sinkendem pH-Wert um das 10-fache. Bei einem pH-Wert von 6,4 verbleiben daher Kosten von 1830 €/ha und bei pH-Werten unter 5,4 von lediglich noch 183 €/ha.

Der Einsatz von Proteasen zur Desinfektion von Teichen und Sedimenten bedarf einer weiteren fachlichen und rechtlichen Prüfung. Es handelt sich um ein biotechnologisches Produkt, das wegen seiner Unbedenklichkeit auf die Umwelt und Gesundheit, bereits in Waschmitteln Anwendung findet. Ein Einsatz in einem Teich, insbesondere wenn der Besatz abgefischt worden ist, scheint ebenfalls unbedenklich. Ob durch Einbringen externer Proteasen eine beschleunigte Inaktivierung gegenüber den durch Mikroorganismen ausgeschiedenen, ohnehin vorhandenen Proteasen in Sediment und Teichwasser erreicht werden kann, muss geprüft werden.

Zu diesem Zeitpunkt wäre die Empfehlung nach einer Virose im Teich das zeitweilige Trockenlegen bei höheren Temperaturen. Durch die hohen möglichen Bodentemperaturen bei Sonneneinstrahlung im Sommer auf Teichböden, die zur Inaktivierung von VHSV und KHV ausreichen, und die Kombination aus weiteren Einflüssen wie der Erzeugung von Proteasen durch Mikroorganismen im Ökosystem Teich kann auf Desinfektionsmittel verzichtet werden. Es bleibt allerdings sicherzustellen, dass keine weiteren Reservoirs, wie Teichmuscheln oder Kleinfische, im Teich verbleiben und einen neuen Besatz infizieren können.

## 8 Zusammenfassung

Im Projekt „Maßnahmen gegen Virose in der ökologischen Aquakultur“, welches gemeinsam mit dem Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg und dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit durchgeführt wurde, sollte der Einfluss verschiedener Desinfektionsstrategien untersucht werden, die nach einem Ausbruch der Krankheiten Virale Hämorrhagische Sepsis (VHS) und Koi Herpesvirus-Infektion (KHV-I) in einem ökologischen Fischteich die verantwortlichen Viren KHV und VHSV zuverlässig inaktivieren. Besonderes Augenmerk sollte auf an Sedimenten gebundenes Virus gelegt werden, da vermutet wird, dass Sedimente als Reservoir für Viren dienen, die nach dem Bespannen einen Neubesatz von Fischen wieder infizieren können. Auf Grund fehlender Diagnosemethoden, sollte ein Sedimentmodell etabliert werden, um im Labor Aussagen über die Tenazität sowie mögliche Desinfektionswege aufzuklären.

Um dieses Ziel zu erreichen und den ökologisch wirtschaftenden Teichwirten Empfehlungen für eine sichere Desinfektion von Erdteichen nach einem Ausbruch der KHV-I oder VHS bereitzustellen, mussten folgende Herausforderungen gelöst werden. Da es sich bei der Desinfektion per Definition um eine Reduktion des viralen Titers um fünf Potenzen handelt, mussten zuerst ausreichende Viruskonzentrationen in den Virus-Wirt-Systemen hergestellt werden, um solche Untersuchungen durchführen und adäquat dokumentieren zu können: In der gängigen Literatur sind im Fall des KHV bis zu diesem Zeitpunkt keine Titer erreicht worden, die das ermöglichen würden. Eine Optimierung der *in vitro* KHV-Replikation stellte folglich eine Grundvoraussetzung dar, um die geplanten Versuche mit dem Virus realisieren zu können. Zur Auswertung mussten valide analytische Methoden etabliert werden, um die infektiösen Viruspartikel zu quantifizieren. Der amtlich anerkannte Goldstandard für den Nachweis von KHV ist der Genomnachweis über eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative real-time Polymerase Chain Reaction*, qPCR) nach Gilad *et al.* (2004). Beim VHSV hingegen wird zuerst eine Isolierung in Zellkultur mit anschließendem Erregernachweis - mittels *Reverse Transcriptase*-PCR oder immunologischer Methode - empfohlen. Allerdings kann sowohl beim KHV als auch beim VHSV eine Aussage über die Infektiosität der Viren nur mittels Zellkultur getroffen werden. Deswegen werden in dem hier vorgestellten Projekt die Endverdünnungsverfahren zur Bestimmung der Infektiosität an Zellkulturen herangezogen. Mit diesem Vorgehen können sowohl Versuche zur Adsorption der Viren an verschiedene Materialien bestimmt als auch der Einfluss der in dem Projekt benannten Desinfektionslösungen untersucht werden. In ökologischen Aquakulturen zugelassene Desinfektionsmittel sind dabei Branntkalk sowie Peressigsäure. Zuzüglich werden hier erstmals auch Proteasen zu Desinfektionszwecken vorgeschlagen.

Mittels verfahrenstechnischer Optimierung des Virus-Wirt-Systems konnte der Titer des KHV weit über die benötigte Infektiosität auf  $1 \times 10^8$  plaque-forming units (PFU) per mL erhöht werden. Dazu diente eine Kombination aus dem Virusisolat KHV-TP30 mit den *common carp brain* (CCB) Zellen. Das System zur Replikation von VSV Fi13 mit *Rainbow trout fin* (RTF) Zellen wurde mit Titern von über  $1 \times 10^9$  PFU/mL vom LGL (Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) zur Verfügung gestellt.

Die Bestimmung der minimalen Konzentrationen, die zu einer Desinfektion führen, erfolgte zunächst in Suspension, bei gewählter Einwirkzeit von 24 h. Besonders effektiv war dabei die Änderung des pH-Werts der Lösung auf unter 4,5 oder über 12, die bei beiden

Viren zu einer vollständigen Inaktivierung führten. Die Peressigsäure wirkte bei beiden Erregern in Endkonzentrationen von 0,1 vol.-%, die mit Literaturangaben übereinstimmen. Ein Vergleich mit Wasserstoffperoxid wies ähnliche Desinfektionskonzentrationen von 0,1 vol.-% auf. Die notwendige Konzentration des Branntkalks konnte auf 10 mmol/L bestimmt werden. Mit der verwendeten Protease, die unter der Markenbezeichnung Neutrase® vertrieben wird, konnte bei Konzentrationen von 8 U/L eine vollständige Inaktivierung beobachtet werden. Die Aufwandmengen bezogen auf Kulturmedium mit pH 7,4, wobei eine zu desinfizierende Bodenschicht von 10 cm mit einem Wassergehalt von 65 % angenommen wird, belaufen sich auf 1.550 L/ha Peressigsäure respektive 370 kg/ha Branntkalk. Die pH-Werte von Teichböden weisen eine Bandbreite von 4,8 bis 7,8 auf und betragen durchschnittlich 6,3. Je niedriger der pH-Wert des Teiches ist, desto mehr Branntkalk muss ausgebracht werden (Faktor 5 je Einheit pH-Wert). Die auszubringende Menge Peressigsäure zur pH-Absenkung ist bei niedrigeren pH-Werten geringer (Faktor 10 je Einheit pH-Wert). Auf sehr sauren Teichböden ist keine Desinfektion mehr erforderlich bzw. ist die Desinfektion mittels Peressigsäure anstelle des Einsatzes von Branntkalk zu erwägen.

Die verwendete Formulierung des Wasserstoffperoxids mit 3 % im Ausgang wäre mit 5.170 L/ha keine Alternative. Ebenso ist die Neutrase® als Lösung mit 0,8 U/g kein einsetzbares Desinfektionsmittel, da hiervon 6,5 - 30 t/ha benötigt würden. Jedoch ist diese Protease auch in einer anderen Formulierung mit 500 U/mg erhältlich, wodurch die aufzuwendende Menge lediglich 10 - 50 g/ha betrüge.

In den nächsten Schritten konnten diese Desinfektionsmethoden mit an Quarzsand adsorbierten Viren nachvollzogen werden. Peressigsäure und Branntkalk eigneten sich hierbei wiederum in den gleichen Konzentrationen zur vollständigen Inaktivierung beider Viren. Um andere Einflüsse auszuschließen wurden zudem Stabilitätsversuche der Viruspartikel in Suspensionen unter Temperaturvariation durchgeführt. Alle hier untersuchte Desinfektionsmethoden beruhen auf Zerstörung/Denaturierung der Proteinhülle, die das genetische Material der untersuchten Erreger schützt. Dies verhindert in der Folge das Eintreten der Viren in die Wirtszellen und führt zu deren Inaktivierung. Das VHSV zeigte bei Temperaturen ab 28°C eine vollständige Inaktivierung innerhalb von 24 Stunden. Das KHV hat eine etwas höhere Toleranz und verlor seine Aktivität erst ab 35°C innerhalb von 48 Stunden.

Die in der Arbeit untersuchten Reagenzien eignen sich grundsätzlich zur Desinfektion der Viren in Teichen. Daher sollte in weiteren Schritten die Übertragung der Laborergebnisse und deren praktische Umsetzung auf Teiche mit ihrer wesentlich komplexeren Ökologie überprüft werden. Neben den stark variierenden pH-Werte in den untersuchten Teichen sollte die Aktivität der Mikroorganismen berücksichtigt werden.

Auch bei erfolgreicher Desinfektion von Teichwasser und Sediment müssen zur Beseitigung der Infektiosität u.a. Muscheln oder Kleinfische als denkbare weitere Reservoirs ausgeschlossen werden. Die in den Laborversuchen ermittelten Mengen an auszubringenden Desinfektionsmitteln basieren auf vollständiger Inaktivierung sehr hoher Viruskonzentrationen, die in realen Aquakulturen nicht oder nur punktuell auftreten würden. Darüber hinaus deuten die Stabilitätsuntersuchungen der Viren, die durch Literatur untermauert werden, darauf hin, dass eine Kombination der natürlichen Faktoren nach dem Ablassen eines Teiches zur Inaktivierung der Viruspartikel ausreichen können. Dazu gehören nicht nur Licht-, Feuchte- und Temperatureinfluss, sondern auch die in einem Teich vorhandene reiche Mikroflora. Autochthone Mikroorganismen in Teichwasser und Sedimenten bilden natürliche Proteasen, deren Wirkung auf die Proteinhülle der untersuchten Vi-

ren zur Inaktivierung in einem gewissen Zeitraum führt. Durch die Sonneneinstrahlung können höhere Temperaturen von mehr als 30°C im Sediment erreicht werden, wodurch alle Prozesse beschleunigt werden. Deshalb wird empfohlen den Teich nach einer Virose bei höheren Temperaturen zeitweise trocken zu legen.



## Literaturverzeichnis

- Aggarwal, Kunal; Jing, Frank; Maranga, Luis; Liu, Jonathan (2011): Bioprocess optimization for cell culture based influenza vaccine production. In: *Vaccine* 29 (17), S. 3320–3328. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.01.081.
- Bergmann, S. M.; Kempter, J.; Sadowski, J.; Fichtner, D. (2006): First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Poland. In: *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 26 (2), S. 97–104.
- Bergmann, S. M.; Riechardt, M.; Fichtner, D.; Lee, P.; Kempter, J. (2010): Investigation on the diagnostic sensitivity of molecular tools used for detection of koi herpesvirus. In: *Journal of Virological Methods* 163 (2), S. 229–233. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.09.025.
- Davidovich, M.; Dishon, A.; Ilouze, M.; Kotler, M. (2007): Susceptibility of cyprinid cultured cells to cyprinid herpesvirus 3. In: *Arch Virol* 152 (8), S. 1541–1546. DOI: 10.1007/s00705-007-0975-4.
- Dixon, P. F.; Smail, D. A.; Algoët, M.; Hastings, T. S.; Bayley, A.; Byrne, H. et al. (2012): Studies on the effect of temperature and pH on the inactivation of fish viral and bacterial pathogens. In: *Journal of Fish Diseases* 35 (1), S. 51–64. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2011.01324.x.
- Eide, K. E.; Miller-Morgan, T.; Heidel, J. R.; Kent, M. L.; Bildfell, R. J.; LaPatra, S. et al. (2011): Investigation of Koi Herpesvirus Latency in Koi. In: *Journal of Virology* 85 (10), S. 4954–4962. DOI: 10.1128/JVI.01384-10.
- Enzmann P.-J. and B. Bruchhof (1989) Comparative studies on viral haemorrhagic septicaemia viruses and infectious haematopoietic necrosis virus. An attempt to demonstrate an immunological relationship. In: *Fish Health Protection Strategies* (Lillelund, K. and Rosenthal, H., Eds.) S. 107-120. Bundesministerium für Forschung und Technologie, Bonn.
- Fuchs, Walter; Fichtner, Dieter; Bergmann, Sven M.; Mettenleiter, Thomas C. (2011): Generation and characterization of koi herpesvirus recombinants lacking viral enzymes of nucleotide metabolism. In: *Arch Virol* 156 (6), S. 1059–1063. DOI: 10.1007/s00705-011-0953-8.
- Hedrick, R. P.; Gilad, O.; Yun, S.; Spangenberg, J. V.; Marty, G. D.; Nordhausen, R. W. et al. (2000): A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. In: *journal of aquatic animal health* 12 (1), S. 44–57. DOI: 10.1577/1548-8667(2000)012<0044:AHAWMM>2.0.CO;2.
- Hintermeier-Erhard, G.; Zech, W. (1997): Wörterbuch der Bodenkunde: Systematik, Genese, Eigenschaften, Ökologie und Verbreitung von Böden. Stuttgart, Paul Enke Verlag
- Homeier-Bachmann, Dr. T.; Beidler, A.; Kubitz, H. (2014): Tiergesundheitsjahresbericht 2012. Hg. v. Friedrich-Loeffler-Institut. Bundesgesundheitsinstitut für Tiergesundheit. Greifswald-Insel Riems (Tiergesundheitsjahresbericht, 13).
- Honjo, Mie N.; Minamoto, Toshifumi; Kawabata, Zen'ichiro (2012): Reservoirs of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) DNA in sediments of natural lakes and ponds. In: *Veterinary Microbiology* 155 (2-4), S. 183–190. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.09.005.

- Kasai, H.; Muto, Y.; Yoshimizu, M. (2005): Virucidal effects of Ultraviolet, heat treatment and disinfectants against Koi Herpesvirus (KHV). In: *Fish Pathology* 40 (3), S. 137–138.
- Krell, P. (1996): Passage effect of virus infection in insect cells. In: *Cytotechnology* (20), S. 125–137.
- Lin, S.-L.; Cheng, Y.-H.; Wen, C.-M.; Chen, S.-N (2013): Characterization of a novel cell line from the caudal fin of koi carp *Cyprinus carpio*. In: *J Fish Biol* 82 (6), S. 1888–1903. DOI: 10.1111/jfb.12116.
- Lorenzen, E.; Carstensen, B.; Olesen, N. J. (1999): Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. In: *Diseases of aquatic organisms* (37), S. 81–88.
- Matsui, K.; Honjo, M.; Kohmatsu, Y.; Uchii, K.; Yonekura, R.; Kawabata, Z. (2008): Detection and significance of koi herpesvirus (KHV) in freshwater environments. In: *Freshwater Biology* 53 (6), S. 1262–1272. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2007.01874.x.
- Maranga, L.; Brazao, T. F.; Carrondo, M. J. T. (2003): Virus-like particle production at low multiplicities of infection with the baculovirus insect cell system. In: *Biotechnol. Bioeng.* 84 (2), S. 245–253. DOI: 10.1002/bit.10773.
- Michel B, Fournier G, Lieffrig F, Costes B, Vanderplasschen A (2010): Cyprinid herpesvirus 3. *Emerg Infect Dis.* 16, S. 1835–1843.
- Neukirch, M.; Böttcher, K.; Bunnajirakul, S. (1999): Isolation of a virus from koi with altered gills. In: *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19 (5), S. 221–224.
- Neukirch M. (2003): Effect of different temperatures and pH values on the infectivity of viruses isolated from koi. In: 11th International Conference EAAP, 21–26 September 2003, Malta, Abstr. P-80
- Oberle, M., Wedekind, H., Kurz, E. und C. Elst (2014): Erhebungen zu Teichpflegemaßnahmen mit Bedeutung für die Gesunderhaltung von Fischbeständen in der Bayerischen Karpfenteichwirtschaft, Poster, XV. EAAP-Tagung vom 08. – 10.10. 2014, Starnberg
- Perelberg, Ayana; Ronen, Ariel; Hutoran, Marina; Smith, Yoav; Kotler, Moshe (2005): Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine. In: *Vaccine* 23 (26), S. 3396–3403. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.01.096.
- Piačková, V.; Flajšhans, M.; Pokorová, D.; Reschová, S.; Gela, D.; Čížek, A.; Veselý, T. (2013): Sensitivity of common carp, *Cyprinus carpio* L., strains and crossbreeds reared in the Czech Republic to infection by cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3; KHV). In: *J Fish Dis* 36 (1), S. 75–80. DOI: 10.1111/jfd.12007.
- PIK, (2013): <https://www.pik-potsdam.de/services/climate-weather-potsdam/climate-diagrams/ground-temperature>, Stand 21.12.2014
- Reed, L. J.; Muench, H. (1938): A simple method of estimating fifty per cent endpoints. In: *The American Journal of Hygiene* 27 (3), S. 493–497.
- Radosavljevic, Vladimir; Jeremic, Svetlana; Cirkovic, M.; Lako, B.; Milicevic, Vesna; Potkonjak, A.; Nikolin, V. (2012): Common fish species in polyculture with carp as cyprinid herpes virus 3 carriers. In: *Acta vet (Beogr)* 62 (5-6), S. 675–681. DOI: 10.2298/AVB1206675R.

Scheffer, F.; Schachtschabel, P. (1960): Lehrbuch der Agrikulturchemie und Bodenkunde, I. Teil, Bodenkunde. 5. neubearbeitete Auflage. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1960, S. 332

Shimizu, T.; Yoshida, N.; Kasai, H.; Yoshimizu, M. (2006): Survival of Koi Herpesvirus (KHV) in Environmental Water. In: *Fish Pathology* 41 (4), S. 153–157.

Schroeder, D. (1992): Bodenkunde in Stichworten. 5. revidierte und erweiterte Auflage von Winfried E. H. Blum. Hirt in Gebrüder Borntraeger, Berlin; Stuttgart; S. 175

Yoshida, N.; Sasaki, R-k; Kasai, H.; Yoshimizu, M. (2013): Inactivation of koi-herpesvirus in water using bacteria isolated from carp intestines and carp habitats. In: *J Fish Dis* 36 (12), S. 997–1005. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2012.01449.x.

Yuasa, K.; Sano, M. (2009): Koi Herpesvirus: Status of Outbreaks, Diagnosis, Surveillance, and Research. In: *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 61 (3), S. 169–179.

Zhou, Jingxiang; Wang, Hao; Zhu, Xia; Li, Xingwei; Lv, Wenliang; Zhang, Dongming (2013): The primary culture of mirror carp snout and caudal fin tissues and the isolation of Koi herpesvirus. In: *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 49 (9), S. 734–742. DOI: 10.1007/s11626-013-9661-x.

## 9 Veröffentlichungen

Adam Mletzko; Anette Amtmann; Anna Becker; Jürgen Christian; Martin Oberle; Helmut Wedekind; Rainer Buchholz (2014): Replikation des Cypriniden-Herpesvirus 3 in Zellkulturen. Präsentation, XV. EAFFP-Tagung vom 08. – 10.10.2014, Starnberg

Adam Mletzko; Anette Amtmann; Anna Becker; Jürgen Christian; Martin Oberle; Helmut Wedekind; Rainer Buchholz (2014): Inoculation of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) in cell cultures. Poster presentation on ISPPP 2014, Wuerzburg, Germany

Kirsten Steinke, Jürgen Christian, Martin Oberle, Helmut Wedekind (2014): Desinfektion von Teichböden – Einfluss der Temperatur auf die Tenazität von VHS-Viren. Poster, XV. EAFFP-Tagung vom 08.10.-10.10. 2014, Starnberg

## 10 Anhang

*Tabelle 17: Gehalt an Ammonium-N (mg/100 g Boden trocken) in Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns\**

<b>Teichgebiet</b>	<b>n</b>	<b>Durchschnitt</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>Aischgrund</b>	25	8,7 ± 4,9	2,6	19,7
<b>Ansbacher Land</b>	21	8,8 ± 4,6	4,1	21,2
<b>Tirschenreuth</b>	20	9,8 ± 5,2	2,6	20,5
<b>Schwandorf</b>	20	12,1 ± 7,2	3,9	27,0
<b>Insgesamt</b>	86	9,8 ± 5,6	2,6	27,0

\*Bei der Analyse des Ammoniumgehaltes musste aufgrund der geringen Trockenmasse der Proben diese zunächst getrocknet werden. Die Werte sind daher möglicherweise verfälscht und nicht aussagekräftig.

*Tabelle 18: Gehalt an Nitrat-N (mg/100 g Boden trocken) in Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns*

<b>Teichgebiet</b>	<b>n</b>	<b>Durchschnitt</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>Aischgrund</b>	25	0,15 ± 0,03	0,10	0,24
<b>Ansbacher Land</b>	21	0,15 ± 0,03	0,12	0,23
<b>Tirschenreuth</b>	20	0,17 ± 0,07	0,09	0,34
<b>Schwandorf</b>	20	0,17 ± 0,04	0,10	0,25
<b>Insgesamt</b>	86	0,16 ± 0,05	0,09	0,34

*Tabelle 19: Gehalt an Calcium (mg/100 g Boden trocken) in Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns*

<b>Teichgebiet</b>	<b>n</b>	<b>Durchschnitt</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>Aischgrund</b>	25	155,8 <sup>a</sup> ± 50,8	61,3	246,3
<b>Ansbacher Land</b>	21	151,2 <sup>a</sup> ± 54,5	75,3	268,8
<b>Tirschenreuth</b>	20	94,7 <sup>b</sup> ± 47,2	26,8	189,6
<b>Schwandorf</b>	20	121,3 ± 52,7	38,6	249,9
<b>Insgesamt</b>	86	132,5 ± 56,2	26,8	268,8

Tabelle 20: Gehalt an Magnesium (mg/100 g Boden trocken) in Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	25	44,8 <sup>a</sup> ± 22,1	17,9	94,4
Ansbacher Land	21	36,2 <sup>a</sup> ± 25,3	4,7	95,2
Tirschenreuth	20	23,6 <sup>b</sup> ± 12,3	6,9	48,2
Schwandorf	20	17,6 <sup>b</sup> ± 9,9	5,8	37,3
<b>Insgesamt</b>	86	31,4 ± 21,5	4,7	95,2

Tabelle 21: Gehalt an Kalium (mg/100 g Boden trocken) in Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	25	5,9 <sup>a</sup> ± 2,4	2,6	9,6
Ansbacher Land	21	4,0 <sup>b</sup> ± 1,4	1,8	6,5
Tirschenreuth	20	3,5 <sup>b</sup> ± 1,5	1,2	5,6
Schwandorf	20	4,1 <sup>b</sup> ± 2,1	1,7	10,3
<b>Insgesamt</b>	86	4,5 ± 2,1	1,2	10,3

Tabelle 22: Gehalt an Natrium (mg/100 g Boden trocken) in Teichböden aus verschiedenen Teichgebieten Bayerns

Teichgebiet	n	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Aischgrund	25	2,7 ± 2,1	0,7	8,4
Ansbacher Land	21	1,6 ± 1,3	0,6	5,3
Tirschenreuth	20	3,5 ± 1,5	1,2	5,6
Schwandorf	20	4,1 ± 2,1	1,7	10,3
<b>Insgesamt</b>	86	2,4 ± 2,3	0,4	15,6

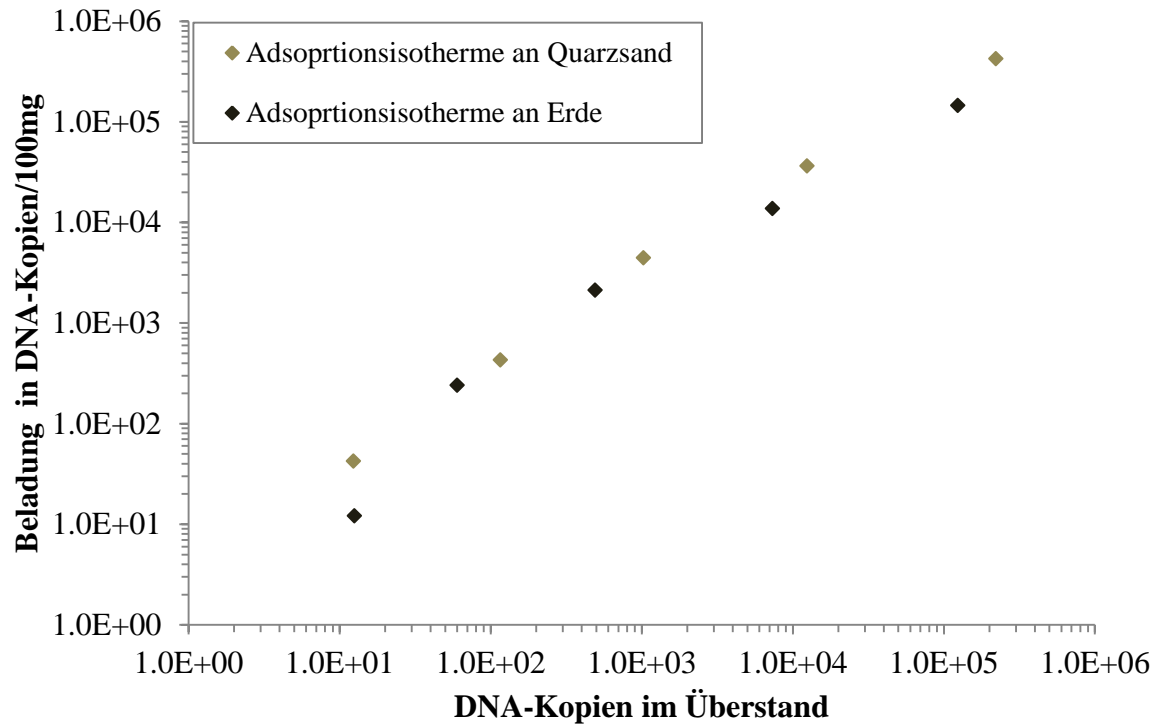


Abbildung 29: Beladung von KHV an Boden- sowie Quarzsandproben bestimmt mittels qPCR nach Gilad et al. (2004)

Haupteinheiten GK500	
	Finis, Gletscher - Eis
	Schwemmfächer und Schuttkegel, z.T. auch jungpleistozän - Schutt, z.T. lehmig
	Hängschutt und -lehm, z.T. auch jungpleistozän - Schutt, z.T. lehmig
	Bergsturzmasse, z.T. auch jungpleistozän - Schutt, z.T. lehmig
	Torf
	Sinterkalk (Kalktuff, Alm) - Kalk, locker bis Kalkstein, porös
	Ablagerungen im Auenbereich, meist jungholozän, und polygenetische Talfüllung, z.T. wärmzeitlich - Mergel, Lehm, Sand, Kies, z.T. Torf
	Schotter, alt- bis mittelholozän - Kies, sandig
	Seeablagerungen, wärmzeitlich bis holozän, vereinzelt auch älter - Ton, Schluff, Mergel, Kalkschluff (Seekreide), Sand
	Flugsand, z.T. als Düne - vorwiegend Mittelland
	Löß, Lößlehm, Decklehm, z.T. Fließerde - vorwiegend Schluff bzw. Lehm
	Schotter, wärmzeitlich (Niederterrasse, Spätglazialterrasse; in Apenninern auch Frühwärmzeitlich mit Seeablagerungen) - Kies, sandig; in Nordbayern auch Sand
	Jungmoräne (wärmzeitlich) mit Endmoränenzügen, z.T. mit Vorstoßschotter - Kies, sandig bis tonig-schluffig, z.T. Konglomerat
	Terrassenschotter und -sand, ungegliedert (nur in Nordbayern) - Kies, Sand
	Schotter, ribezialisch (Hochterrasse) - Kies, sandig, z.T. Konglomerat
	Schotter, mindelzeitlich (Jüngerer Deckenschotter) - Kies, sandig, z.T. Konglomerat
	Altmoräne mit Endmoränenzügen, z.T. mit Vorstoßschotter - ribezialisch - Kies, sandig bis tonig-schluffig, z.T. Konglomerat
	Altmoräne mit Endmoränenzügen, z.T. mit Vorstoßschotter - mindelzeitlich und älter - Kies, sandig bis tonig-schluffig, z.T. Konglomerat
	Schotter, donau- bis günnzeitlich (Älterer Deckenschotter) - Kies, sandig, z.T. Konglomerat
	Schotter, biberzeitlich (Ältester Deckenschotter) - Kies, sandig, z.T. Konglomerat
	Alkalibasalt, Pyroklastit, pleistozän-Tholozän (im NW und S von Cheb/Eger) - Alkalibasalt, Pyroklastit, pleistozän-Tholozän
	Schotter, pliozän bis ältestpleistozän, z.T. altpleistozän, ungegliedert (Ünonsu, Urmain, Urnaab u.ä.) - Kies, sandig (Restschotter)
	Ablehm (Rückstandslehm mit Lößlehm), tertiär bis pleistozän - Lehm (Ton-Schluff-Gemisch), z.T. mit Sand, Schutt
	Obere Süßwassermolasse, ungegliedert - Ton, Schluff, Mergel, Sand, im O auch Kies, alpenrandnah als Festgestein
	Obere Süßwassermolasse, kiesführend, jüngerer Teil - Ton, Schluff, Mergel, Sand, Kies
	Obere Süßwassermolasse, kiesführend, Quarzreichtum - Ton, Schluff, Mergel, Sand, vorwiegend Quarzkies
	Obere Süßwassermolasse, kiesführend, älterer Teil - Ton, Schluff, Mergel, Sand, Kies
	Obere Süßwassermolasse, kiesführend, Konglomerat, alpenrandnah und Juragangfluh der Schwäbischen Alb - Mergel, Sandstein, Konglomerat
	Süßbrackwassermolasse - Ton, Schluff, Mergel, Sand, Kies, Kalkstein
	Obere Meeressmolasse, im E mit Oberer Brackwassermolasse - Ton, Schluff, Mergel, Sand, alpenrandnah als Festgestein, mit Konglomerat
	Untere Süßwassermolasse, jüngerer Teil - Ton, Schluff, Mergel, Sand, alpenrandnah als Festgestein, mit Konglomerat
	Untere Meeressmolasse, jüngerer Teil, mit Unterer Brackwassermolasse - Ton, Schluff, Mergel- und Sandstein, bereichsweise Konglomerat
	Untere Süßwassermolasse, älterer Teil - Ton, Schluff, Mergel- und Sandstein, Konglomerat
	Untere Meeressmolasse, älterer Teil - Ton, Schluff, Mergel- und Sandstein, bereichsweise Konglomerat
	Inneralpine Molasse - Ton, Schluff, Mergel- und Sandstein, bereichsweise Konglomerat, lokal Kreide
	Nordhelvetischer Flysch - Ton-, Schluff- und Sandstein
	Dreiangelserie bis Globigerinenmergel - Mergel- und Sandstein, Großfloramiferen- und Rotlagenstein (z.T. mit Braunesener)
	Kreide in helvetischer Fazies, ungegliedert - Kalkstein, z.T. kieselig, Mergelstein und Sandstein
	Seewer Kalk bis Hochauer Schichten - Mergel- und Kalkstein, abschnittsweise Sandstein
	Schrottenkalk bis Garschella-Formation - Kalk- und Sandstein (z.T. mit Phosphorit und stratigraphischer Kondensation), z.T. Mergelstein
	Pelfrieschichten bis Drebbergschichten (z.T. auch bis Schrottenkalk und Garschella-Formation) - Kalkstein, z.T. kieselig, Mergelstein, z.T. Sandstein
	Schiltschichten bis Zementsteinschichten - Kalk- und Mergelstein (im vermuteten Dogger auch Sandstein)
	Schuppenzonen aus Gesteinen des Helvetikums, Ultrahelvetikums, Feuerstätter Flyschs, Südrhätelvetikums und Rhodanubischen Flyschs - Ton-, Schluff-, Mergel- und Sandstein, vereinzelt Konglomerat, Kalkstein
	Buntmergelerde (Ultrahelvetikum) mit lokal Südrhätelvetikum und Grautener Klippenzone - Mergel-, Ton-, Schluff- und Sandstein, Konglomerat, Kalkstein, Radiolarit, Kohle
	Feuerstätter Flysch - Ton-, Schluff-, Mergel- und Sandstein, lokal Konglomerat und Breccie, mit Kalkstein und basischen Vulkaniten
	Unternoggschichten - Ton-, Schluff-, Mergel- und Sandstein, lokal Konglomerat und Breccie
	Rhodanubischer Flysch: Untere Bunte Mergel bzw. Ötztalmergelschichten bis Ansbang-Formation - Ton-, Schluff-, Mergel- und Sandstein, lokal Konglomerat, Kalkstein
	Rhodanubischer Flysch: Tristelochschichten bis Quarzserie - Ton-, Schluff- und Sandstein, Kalkstein
	Klippe von Grabs - Ton-, Schluff-, Mergel- und Sandstein, lokal Konglomerat, Kalkstein, z.T. hornsteinführend
	Walterbergserie (Kreide) - Ton-, Schluff-, Mergel- und Sandstein
	Arosa-Zone (Paläozoikum-Kreide) - Ton-, Schluff-, Mergel- und Sandstein mit Konglomerat, Breccie, Kalk- und Dolomitstein, Radiolarit, basischen Vulkaniten, Metamorphiten
	Alttertiärgesteine des Beckens von Reichenhall - Mergel- und Sandstein, Konglomerat, Breccie, Kalkstein
	Gosau - Mergel- und Sandstein, Konglomerat, Breccie (z.T. Megabreccie), Kalkstein
	Losensteiner Schichten, Brandfleckschichten, Lechtaler Kreideschiefer - Ton-, Schluff-, Mergel- und Sandstein, Konglomerat, Breccie (z.T. Megabreccie)
	Schrambachschichten, Raßfeldschichten, Tannheimer Schichten - Kalkstein, Ton-, Schluff-, Mergel- und Sandstein, Konglomerat, Breccie
	Liasbasiskalk bis Ammergauer Schichten - Kalkstein, z.T. knollig-faserig, z.T. kieselig, Mergelstein, Radiolarit, lokal Konglomerat und Breccie
	Hallstätter Kalk, Pötschenkalk, Pedataschichten - Kalkstein, z.T. hornsteinführend, bereichsweise Dolomitstein
	Oberäckerkalk - Kalkstein, lokal Dolomitstein, Kössener Schichten (- Mergel- und Kalkstein, lokal Ton- und Schluffstein), Zämbachmergel (- Kalk- und Mergelstein)
	Hauptdolomit, östlich der Saarlach auch karnisch-norscher Dolomit und Dachsteindolomit - Dolomitstein, lokal Ton- und Schluffstein, Bitumenmergel, Konglomerat, Breccie, Kalkstein
	Dachsteinkalk - Kalkstein, bereichsweise Dolomitstein
	Plattenkalk - Kalk- und Dolomitstein, lokal Mergelstein
	Rabler Schichten bis Cerdtassschichten - Ton-, Schluff-, Mergel- und Sandstein, Kalk- und Dolomitstein, Rauhwacke, Gips
	Anbergschichten - Kalk-, Dolomit- und Mergelstein, bei Lech basische Vulkanite und Tuffe
	Ramsaudolomit, Wettersteindolomit - Dolomitstein, lokal Kalkstein
	Wettersteinkalk - Kalkstein (lokal mit Blei-Zink-Erzen), bereichsweise Dolomitstein
	Parthenschichten - Ton-, Schluff-, Mergel- und Kalkstein
	Alpiner Muschelkalk (Virgoliakalk bis Reiflinger Kalk) - Kalkstein, z.T. hornsteinführend, lokal Dolomitstein, gelegentliche Tuff und Tuffe
	Reichenhaller Schichten, im E mit Gutensteiner Schichten - Kalk- und Dolomitstein, Rauhwacke, Breccie
	Werfener Schichten (- Ton-, Schluff- und Sandstein, im oberen Abschnitt Kalkstein), Bundsandstein, Alpiner Verruano bis Mitterberger Schichten (- Ton-, Schluff- und Sandstein, z.T. Konglomerat und Breccie)
	Haselgebirge - Anhydrit, Gips, Steinsalt, Ton- und Dolomitstein
	Wildschönauer Schiefer, Pinzgauer und Ennstaler Phyllit - Phyllit, Tonchiefer, Sandstein (Grauwacke), lokal Konglomerate, Kalk- und Dolomitstein, Kieschiefer, Grünschiefer
	Schwarzer Dolomit, Spießbergdolomit u.ä. Karbonatgesteine - Dolomitstein, daneben Kalkstein und Kieschiefer
	Diabas, Diabasporphyrin, Grünschiefer, Tuff, Tuffit - Diabas, Diabasporphyrin, Grünschiefer, Tuff, Tuffit
	Gabbro, Gabbroamphibolit, lokal Serpentin
	Porphyrit, Porphyroid (Biossenockporphyroid) - Quarzporphyr, Tuff, Tuffit

Abbildung 30: Legende zu Abbildung 26