

---

Schlussbericht zum Thema

---

# Untersuchung der Proteasen-Nutzung zur Bekämpfung von Fischviren in Aquakulturen

FKZ: 2815NA062; 2815NA088; 2815NA090

Projektnehmer/Projektnehmerin:

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau (BÖL) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische Landwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) finanziert und in der BÖL-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in die Praxis umgesetzt. Das Programm gliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder - das Forschungs- und das Informationsmanagement.

**Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter:**

[www.bundesprogramm.de](http://www.bundesprogramm.de)  
[www.oekolandbau.de/forschung](http://www.oekolandbau.de/forschung)

**Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:**

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung  
Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
Deichmanns Aue 29  
53179 Bonn  
Tel.: 0228-6845-3280  
E-Mail: [boel-forschung@ble.de](mailto:boel-forschung@ble.de)

# Schlussbericht

**Titel: „Untersuchung der Proteasen-Nutzung zur Bekämpfung von Fischviren in Aquakulturen“**

**Akronym: PRO-FI**

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages



**Förderkennzeichen: 2815NA062/2815NA088/ 2815NA090**

**Projektlaufzeit: 01. Juli 2016 – 31. Dezember 2019**

---

## Zuwendungsempfänger:

**Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (BVT), FKZ: 2815NA062  
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU),  
Paul-Gordan-Str. 3, 91052 Erlangen**

**Projektleitung und Koordination:**

Dr. Anna Becker, Tel: 09131 85-23054; Fax: 09131 85-23002; E-Mail: [anna.maria.becker@fau.de](mailto:anna.maria.becker@fau.de)

---

**Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Institut für Infektionsmedizin, FKZ: 2815NA088  
Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems**

**Projektleitung FLI:**

Dr. Dr. habil. Sven M. Bergmann, Tel.: +49 38351 7-1150; Fax.: +49 38351 7-1226,  
E-Mail: [sven.bergmann@fli.de](mailto:sven.bergmann@fli.de)

**Projektbearbeitung:** Yeon-Hwa Jin, [Yeonhwa.Jin@fli.de](mailto:Yeonhwa.Jin@fli.de)

---

**Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), FKZ: 2815NA090  
Institut für Fischerei, Greiendorfer Weg 8, 91315 Höchstadt/Aisch**

**Projektleitung LfL:**

Dr. Martin Oberle, Tel.: +49 9193 50890, Fax: + 49 9193 4414, E-Mail:  
[martin.oberle@lfl.bayern.de](mailto:martin.oberle@lfl.bayern.de)

**Projektbearbeitung:** Dr. Jan Másílko, [Jan.Masilko@lfl.bayern.de](mailto:Jan.Masilko@lfl.bayern.de)

---

## Assoziierter Partner:

**Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Sachgebiet Virologie  
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen**

**Ansprechpartner:**

Dr. Jürgen Christian, Tel.: +49 9131 6808-2638, Fax: 09131 6808-2690  
E-Mail: [juergen.christian@lgl.bayern.de](mailto:juergen.christian@lgl.bayern.de)

## Kurzfassung (max. 2000 Zeichen)

**Titel:** Untersuchung der Proteasen-Nutzung zur Bekämpfung von Fischviren in Aquakulturen

**Autoren:** Amtmann A.<sup>1)</sup>, Zahner-Rimmel P.<sup>1)</sup>, Heidenreich E.<sup>1)</sup>, Másílko J.<sup>2)</sup>, Oberle M.<sup>2)</sup>, Bergmann S.M.<sup>3)</sup>, Jin Y.-H.<sup>3)</sup>, Christian J.<sup>4)</sup>, Becker A.M.<sup>1)</sup>

**Kontaktinformationen:** 1) Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Paul-Gordan-Str. 3, 91052 Erlangen, [anna.maria.becker@fau.de](mailto:anna.maria.becker@fau.de); 2) Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, Greiendorfer Weg 8, 91315 Höchststadt/Aisch, [martin.oberle@lfl.bayern.de](mailto:martin.oberle@lfl.bayern.de); 3) Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Institut für Infektionsmedizin, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, [sven.bergmann@fli.de](mailto:sven.bergmann@fli.de); 4) Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Sachgebiet Virologie Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen, [juergen.christian@lgl.bayern.de](mailto:juergen.christian@lgl.bayern.de)

Auf der Suche nach neuen, umweltfreundlichen und nachhaltigen Desinfektionsmitteln, die nach einer viralen Infektion in Fischteichanlagen eingesetzt werden könnten, wurden hier verschiedene Proteasen und deren Auswirkungen auf die Infektiosität von umhüllten (KHV, VHSV, IHNV) und nicht umhüllten Fischviren (IPNV) untersucht. Für die beabsichtigte Anwendung wurden Proteasen ausgewählt, die kommerziell (Neutrase® & Alcalase® oder Subtilisin), beziehungsweise aus nativen Quellen (Papain) in größeren Mengen verfügbar und in anderen Bereichen bereits zugelassen sind.

Zuerst wurden Wasser- und Bodenproben in den umliegenden Fischteichen untersucht, um deren Qualität abzuleiten. Wie erwartet zeigten die hier gemessenen Werte eine relativ große Bandbreite, dennoch lagen die Mittelwerte der wichtigsten Parameter im normalen und für die Fische verträglichen Bereich.

Die hier ausgesuchten Proteasen wurden bezüglich deren proteolytischen Aktivität unter verschiedenen Bedingungen eingehend untersucht und zeigten eine ausreichend gute Aktivität unter umweltrelevanten Parametern. Zusätzlich nahm deren proteolytische Wirkung im Teichwasser und im Teichsediment rasch ab, sodass keine Inaktivierung nach deren Anwendung notwendig wäre und keine bleibenden Einflüsse auf die Umwelt zu erwarten sind.

In den Laborversuchen konnten alle untersuchten Proteasen die umhüllten Zielviren – KHV, VHSV und IHNV – inaktivieren. Dabei wurde eine Desinfektion am häufigsten mit Hilfe von Neutrase® erreicht. Die Inaktivierung der Viren erfolgte sehr rasch und konnte auch bei den umweltrelevanten pH-Werten sowie in den Teichwasserproben erfolgreich durchgeführt werden. Im Vergleich zur Neutrase® wurde von Alcalase® eine niedrigere Konzentration zur Inaktivierung der Viren benötigt. Hinsichtlich der zur Desinfektion benötigten Menge und der toxischen Wirkung von Proteasen auf die Vertreter des Ökosystems im Teich ist Alcalase® zu bevorzugen. Subtilisin, die chemisch reine Form der Alcalase®, ist derzeit noch zu teuer.

Trotz teilweise rascher Abnahme der Infektiosität von KHV, VHSV und IHNV nach Zugabe zu unsterilen Wasserproben kann eine Inaktivierung dieser Viren in den Umweltwässern unterschiedlich schnell erfolgen, weswegen nach wie vor schnelle und effiziente Desinfektionsmaßnahmen benötigt werden. Diese können - wie hier dargestellt - auch mit Hilfe von Proteasen erfolgen.

## Summary (max. 2000 Zeichen)

**Title:** Investigation of protease use against fish viruses in aquacultures

**Authors:** Amtmann A.<sup>1)</sup>, Zahner-Rimmel P.<sup>1)</sup>, Heidenreich E.<sup>1)</sup>, Másílko J.<sup>2)</sup>, Oberle M.<sup>2)</sup>, Bergmann S.M.<sup>3)</sup>, Jin Y.-H.<sup>3)</sup>, Christian J.<sup>4)</sup>, Becker A.M.<sup>1)</sup>

**Contact:** 1) Institute of Bioprocess Engineering, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg, Paul-Gordan-Straße 3, 91052 Erlangen, Germany, [anna.maria.becker@fau.de](mailto:anna.maria.becker@fau.de); 2) Bavarian State Research Center for Agriculture, Institute for Fisheries, Department for Carp Farming, Greiendorfer Weg 8, 91315 Höchstadt an der Aisch, Germany, [martin.oberle@lfl.bayern.de](mailto:martin.oberle@lfl.bayern.de); 3) Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Infectology, Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems, Germany, [sven.bergmann@fli.bund.de](mailto:sven.bergmann@fli.bund.de); 4) Bavarian Health and Food Safety Authority, Institute for Animal Health II, Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen, Germany,

In the search for new, environmental friendly and sustainable disinfection agents, that can be used after viral infection in fish ponds, proteases and their influence on the infectivity of various enveloped (KHV, VHSV, IHNV) and non-enveloped fish viruses was investigated in this work. For the intended use, proteases that are available at higher volumes and commercially available (Neutrase® and Alcalase® or Subtilisin) or originating from natural sources (papain) were selected for these studies.

At first, water and soil samples from surrounding fish ponds were analyzed in order to evaluate their quality. Despite relatively wide range of the values of the determined parameters, in average they were normal and compatible with requirements for fish culture.

Investigation of the proteolytic activity of the chosen proteases under various parameters showed sufficiently good activities at environmentally relevant conditions. Moreover, their proteolytic activity decreased rapidly in pond water and pond soil, thus no measures for inactivation after their use would be necessary and no permanent consequences for the environment are to be expected.

Under laboratory conditions, all investigated here enveloped viruses – KHV, VHSV, IHNV – could be inactivated with examined proteases, though the disinfection was reached most frequently with Neutrase®. Inactivation of the viruses with proteases occurred rapidly and could also be conducted under the pH-values that were determined in this study and/or directly in the pond water samples. In comparison to Neutrase® less amount of Alcalase® or Subtilisin was needed for inactivation of the viruses. Taking that into consideration and in regard to the toxic effects of both enzymes onto examined species that normally occur in fish ponds, the use of Alcalase® seems to be advantageous. Subtilisin, the pure chemical substance, is recently too expensive.

Although in some cases the infectivity of KHV, VHSV and IHNV after addition to unsterile pond water samples rapidly decreased, the speed of inactivation of these viruses in environmental waters can vary, hence, fast and efficient measures for disinfection are still necessary. However, further studies are needed, as shown in this work this can also be reached by the use of proteases.

## Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung .....	2
Summary .....	3
Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einführung .....	7
1.1 Gegenstand des Vorhabens.....	7
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts .....	7
1.3 Planung und Ablauf des Projektes.....	7
1.3.1 Arbeitspakete .....	8
1.3.2. Meilensteinplanung und Arbeitsprogramm.....	9
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	13
2.1 Fischvirosen .....	13
2.1.1 Cypriniden Herpesvirus 3 (CyHV-3, Koi-Herpesvirus, KHV).....	13
2.1.2 Virale Hämorrhagische Septikämie Virus (VHSV).....	13
2.1.3 Infektiöse Hämato-poetische Nekrose Virus (IHNV) .....	13
2.1.4 IPNV.....	14
2.2 Kontrolle und Bekämpfung der anzeigepflichtigen Tierseuchen .....	14
2.3 Proteasen .....	14
2.3.1 Neutrase .....	16
2.3.2 Subtilisin .....	16
2.3.4 Papain (native Protease) .....	16
2.4 Vorarbeiten der Antragsteller .....	17
3. Material und Methoden.....	17
4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse .....	27
5. Diskussion der Ergebnisse .....	44
6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	50
7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen.....	51
8. Zusammenfassung.....	51
9. Literaturverzeichnis.....	54
10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt .....	57

## Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaaren
BSA	Bovines Serumalbumin
BVT	Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CCB	<i>Common Carp Brain</i> Zellen
C <sub>mic</sub>	Mikrobieller Kohlenstoffgehalt
C <sub>org</sub>	Organischer Gesamtkohlenstoff
CPE	Cytopathischer Effekt
C <sub>t</sub>	Gesamtkohlenstoff
C <sub>t</sub> /N <sub>t</sub>	Humusqualität
CyHV-3	Cypriniden Herpesvirus 3
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>x</sub>	effektive Konzentration/Hemmkonzentration der Wachstumsrate (x%)
EPC	<i>Epithelioma papulosum cyprini</i> Zelllinie
EtOH	Ethanol
FAU	Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (L. f. Bioverfahrenstechnik)
FKS	Fetales Kälber Serum
FKZ	Förderkennzeichen
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Infektionsmedizin
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
ha	Hektar
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
HERA	<i>Human and Environmental Risk Assessment</i>
IHNV	Virus der Infektiösen Hämatoepithelialen Nekrose
IPNV	Virus der Infektiösen Pankreasnekrose
IR	Infrarot
KHV	Koi-Herpesvirus
LFL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, Höchstadt a.d. Aisch
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Sachgebiet Virologie, Erlangen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

N <sub>t</sub>	Gesamtstickstoff
OECD	Die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
NaCl	Natriumchlorid
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Gesamt-Phosphat
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -CAL	Pflanzenverfügbare Phosphor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymeraseketterreaktion
PES	Peroxyessigsäure
qPCR	Quantitative <i>real time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTG-2	<i>Rainbow trout gonadial tissue</i> Zelllinie
SIR	Substratinduzierte Respiration
sp.	Spezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
T <sub>R</sub>	Titerreduktion
TS	Trockensubstanz
T <sub>Start</sub>	Virustiter vor der Behandlung mit Protease bzw. Inkubation
T <sub>End</sub>	Virustiter nach der Behandlung mit Protease bzw. Inkubation
VHSV	Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie



# 1. Einführung

## 1.1 Gegenstand des Vorhabens

Obwohl Aquakulturen eine sehr wichtige Rolle bei der Versorgung mit hochwertigen Lebensmitteln spielen, kämpfen die traditionellen Teichwirtschaften mit Rentabilitätsproblemen. Dazu tragen Fischviren bei, die im Falle einer Infektion zu sehr hohen Mortalitäten und großen Verlusten führen können. Leider existieren in Deutschland bis heute keine einheitlichen Vorgaben für Desinfektionsmaßnahmen nach solchen Ausbrüchen.

In einem bereits abgeschlossenen Verbundprojekt („Maßnahmen gegen Viren in der ökologischen Aquakultur“, FKZ: 2810OE053, BÖLN) wurde erstmals gezeigt, dass eine handelsübliche Protease zur Deaktivierung bestimmter Viren erfolgreich angewendet werden konnte. Allerdings haben die ersten Laborversuche eine Reihe offener Fragen hinterlassen, womit sich ein großer Forschungsbedarf mit der Chance ergibt, ein sehr effektives, umweltfreundliches und finanzierbares Desinfektionsmittel zu finden.

## 1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Um die Suche nach solchen neuartigen Desinfektionsmitteln zu unterstützen, wurden im Rahmen des Projekts verschiedene kommerziell verfügbare Proteasen zur Inaktivierung von verschiedenen Fischviren und deren Anwendbarkeit zur Desinfektion von Teichen nach Ausbrüchen von ökonomisch relevanten Fischviren als auch für deren prophylaktischen Einsatz untersucht.

Dazu musste nicht nur die Inaktivierung der Ziel-Viren mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Proteasen unter umweltrelevanten Rahmenbedingungen untersucht werden, sondern es mussten auch weitere Aspekte ermittelt werden, wie z.B. die Zelltoxizität und deren Einfluss auf die benutzten Testsysteme, die Stabilität/Inaktivierung der Enzyme unter Umweltbedingungen, die Verträglichkeit der Proteasen und ihre infektionshemmende Wirkung bei den Zielfischen sowie auf andere Wasserorganismen. Begleitend zu den Labor- und Tierversuchen sollte die Umsetzung in die Praxis in rechtlicher und ökonomischer Hinsicht überprüft werden.

Somit tragen die in dem Projekt gesammelten Erkenntnisse zur Entwicklung der Strategien für eine Verbesserung der Fischgesundheit und des Tierwohls in der ökologischen und nachhaltigen Aquakultur bei, dessen Ausschreibung als Gegenstand der Förderung der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung im Rahmen des Bundesprogramms „Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN)“ im Bereich „Nachhaltige Aquakultur“ bekannt gegeben wurde (Nr. 12/14/13 vom 27.11.2014).

## 1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Das Forschungsvorhaben wurde in insgesamt vier Arbeitspakete mit unterschiedlichen Schwerpunkten unter den jeweiligen Projektpartnern – BVT, LfL, FLI - aufgeteilt und so geplant, dass die Teilaspekte zeitlich realisierbar waren und parallel bearbeitet werden konnten. Die Projektleitung und Koordination des gesamten Projekts wurde in Abstimmung aller Projektpartner vom BVT übernommen. Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitspakete mit den vorgesehenen Arbeiten dargestellt.

### 1.3.1 Arbeitspakete

#### **Arbeitspaket 1: Koordination des Projektes** (*Leitung: BVT Erlangen, Dr. Anna M. Becker*)

Zu den Aufgaben der Projektleiterin gehörte die Koordination von Datenaustausch und Kommunikation, die Erstellung von Zwischen- und Abschlussberichten sowie die Organisation der Projekttreffen, die in einem Rhythmus von ca. 6 Monaten stattfanden.

#### **Arbeitspaket 2: Untersuchung der Virusinaktivierung durch Proteasen unter relevanten Einflussgrößen** (*Leitung: BVT Erlangen; Mitwirkung: LGL, FLI*)

In diesem Arbeitspaket wurde die Wirkung drei verschiedener kommerziell erhältlicher Proteasen – Neutrase<sup>®</sup>, Alcalase<sup>®</sup> (biotechnologisch hergestellt) und Papain (nativ) auf die bereits etablierten Zellkultur-/Virus-Systeme - Karpfen-KHV und Forelle-VHSV - zuerst unter gleichen Bedingungen (pH 7,4, Temp. 8 und 25 °C, 24 h) geprüft und die für die Virusinaktivierung benötigten Mengen bestimmt. Um die Mengen der Proteasen, die in Zellkulturen angewendet werden können zu bestimmen, wurden zunächst die Zelltoxizitätsgrenzen für die entsprechenden Zelllinien (CCB für KHV, RTG für VHSV und EPC für IHNV) ermittelt. Darüber hinaus wurde auch der Einfluss von Temperatur, pH-Wert und Proteinkonzentration auf die proteolytische Aktivität der Enzyme bzw. Inaktivierung der Zielviren (zunächst KHV und VHSV, später durch IHNV ergänzt) betrachtet. Anschließend wurde der Einfluss von Proteasen auf die Infektiosität von nicht umhülltem Virus am Beispiel vom IPNV untersucht. Ebenso wurde die Zeitabhängigkeit der Virusinaktivierung mit den im Vorfeld ermittelten effektiven Proteasekonzentrationen bei zwei verschiedenen Inkubationstemperaturen (8 und 25 °C), getestet. Ferner wurden die proteolytische Aktivität der ausgesuchten Proteasen sowie die Stabilität von KHV, VHSV und IHNV in verschiedenen Wasserproben (inkl. Umweltwasserproben) geprüft. Schließlich wurde die Inaktivierung von Viren am Beispiel vom KHV mit Hilfe von Neutrase<sup>®</sup> und Alcalase<sup>®</sup> unter vorher bestimmten effektiven Konzentrationen der Enzyme bei 8 °C in zwei verschiedenen Wasserproben (aus Forellen- und Karpfenhaltung) untersucht. Die ermittelten Konzentrationen, Umweltverhältnisse und Parameter für die ausgewählten Proteasen wurden unter den Projektpartnern abgeglichen und ausgetauscht, um sie weiterführend an verschiedenen permanent wachsenden Fischzellen sowie in Tierversuchen (FLI) zu prüfen und die ökonomische Analyse durchzuführen.

#### **Arbeitspaket 3: Untersuchung des Einflusses der Proteasen auf Fische und Krankheitsbekämpfung** (*Leitung: FLI, Mitwirkung: BVT*)

In den Untersuchungen am FLI wurde gezeigt, dass beides, die eingesetzten Proteasen als auch die Viren, eine schädliche Wirkung in den gewählten Konzentrationen für Fische und für Fischzellkulturen darstellt. Wurden jedoch die Behandlungen der Viren mit den Proteasen vor der Infektion der Zellkulturen bzw. der Fische durchgeführt, konnte die Infektiosität der Erreger inaktiviert werden. Beginnend mit hohen Viruskonzentrationen ( $10^6$  bis  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml) und hohen Konzentrationen von Proteasen (40 - 50 mU/ml Neutrase) wurde schnell eine Inaktivierung der behüllten Viren (VHSV, IHNV und KHV) erreicht. Allerdings wirkten sich die Proteasekonzentrationen negativ auf die Fischzellkulturen aus. Bis zu einer Verdünnung von 1:100, teilweise bis 1:1000, konnte die Titerreduktion bei den Viren nicht vollständig ermittelt werden, da die Proteasen die genutzten Fischzellkulturen zerstörten. In den Zellkulturen wurden die VHSV, IHNV und IPNV bei 15°C, das KHV jedoch bei 20 bzw. 26°C überprüft, da diese Temperaturen sowohl für die Fische als auch für die Viren physiologisch sind. In weiteren Untersuchungen an Zellkulturen und folgend am Fisch, wurde die geringste Proteasekonzentration für eine effektive Inaktivierung der behüllten Viren untersucht. Beim

IPNV als nicht umhülltes Virus, gelang auch mit hohen Proteasekonzentrationen keine Inaktivierung. Beim Einsatz der Neutrase® am Fisch war außerdem histologisch ein großer Einfluss auf das Kiemen- und Nierengewebe der Karpfen bzw. Forellen erkennbar. Offenbar schaffte die Neutrase® neue Eintrittspforten für die Viren, so dass Fische bei einer Inaktivierung eines Teils der Erreger infiziert wurden. Bei der Einstellung der Titer der KHV, VHSV und IHNV auf  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml gelang eine komplette Inaktivierung mit 50 mU/ml Neutrase®. Diese Viren waren nicht mehr in der Lage, im Fisch repliziert zu werden.

#### **Arbeitspaket 4: Umsetzbarkeit in die Praxis** (*Leitung: LfL, Mitwirkung: BVT*)

Zunächst wurden Proben von Teichwasser und Teichböden von verschiedenen Ursprungs mit verschiedenen Qualitäten gezogen. Die Untersuchung dieser dient als Grundlage, um die verschiedenen Proteasen im Hinblick auf ihre Desinfektionswirkung unter praktischen Bedingungen bewerten zu können. Diese Proben bzw. ermittelten Werte für Temperatur (Wasser) und pH-Wert (Wasser, Sedimente) wurden an die Projektpartner (BVT, FLI) weitergegeben, um die Durchführung der Protease-Versuche unter umweltrelevanten Bedingungen durchführen zu können. Zusätzlich zu Virusstabilitätsversuchen unter Proteaseneinwirkung (BVT) und Fischversuchen (FLI) wurde die Auswirkung der Proteasen auf Phyto- und Zooplankton, Benthos sowie auf die Aktivität der Mikroorganismen und den Abbau von organischer Substanz in Teichböden vor und nach der Proteasenbehandlung in Laborversuchen überprüft. Gleichzeitig wurde eine Umfrage für die Teichwirte in der Region ausgearbeitet, um deren Erfahrungen mit traditionellen Desinfektionsmaßnahmen und ihre Bereitschaft für die Nutzung solcher innovativen Mittel wie Proteasen zu erfassen. In diesem Zusammenhang wurden Experimente durchgeführt, mit deren Hilfe die natürliche Inaktivierung der relevanten Proteasen unter praktischen Teichbedingungen charakterisiert werden können. So können die für die Beurteilung der praktischen Anwendung notwendigen Kennzahlen bereitgestellt werden.

#### **1.3.2. Meilensteinplanung und Arbeitsprogramm**

In jedem Arbeitspaket wurden einzelne Teilziele – Meilensteine - erörtert und die zeitlichen Rahmen für deren Erreichung festgelegt. Diese sind in der unterstehenden Tabelle 1 zusammengefasst.

<b>Meilenstein (Bearbeiter)</b>	<b>Aufgabe</b>	<b>Bis wann</b>
<b>Arbeitspaket 1: Koordination des Projektes</b>		
<b>Meilenstein 1 (BVT)</b>	Organisation des 1. Projekttreffens	Monat 3
<b>Meilenstein 2 (BVT)</b>	Koordination der Fertigstellung des 1. Zwischenberichts	Monat 12
<b>Meilenstein 3 (BVT)</b>	Organisation des 2. Projekttreffens	Monat 15
<b>Meilenstein 4 (BVT)</b>	Koordination der Fertigstellung des 2. Zwischenberichts	Monat 24
<b>Meilenstein 5 (BVT)</b>	Organisation des 3. Projekttreffens	Monat 27
<b>Meilenstein 6 (BVT)</b>	Koordination der Fertigstellung des Abschlussberichts	Monat 42
<b>Meilenstein 6-1 (BVT)</b>	Koordination der Fertigstellung des 3. Zwischenberichts	Monat 34
<b>Meilenstein 6-2 (BVT)</b>	Organisation des 6. Projekttreffens	Monat 35
<b>Meilenstein 6-3 (BVT)</b>	Organisation des 7. Projekttreffens	Monat 41

<b>Arbeitspaket 2: Untersuchung der Virusinaktivierung durch Proteasen unter rel. Einflussgrößen</b>		
<b>Meilenstein 7 (BVT)</b>	Herstellung der benötigten KHV-/VHSV-Mengen für die Desinfektionsversuche	Monat 6
<b>Meilenstein 8 (BVT)</b>	Untersuchung der Inaktivierung des KHV/VHSV nach 24 h mit kommerziell verfügbaren Proteasen bei pH 7,4, 8 °C	Monat 6
<b>Meilenstein 9 (BVT)</b>	Ermittlung der Zelltoxizität verschiedener Proteasen in permanent wachsenden Fischzellkulturen (CCB und RTG-2)	Monat 12
<b>Meilenstein 10 (BVT)</b>	Etablierung der Zellkultur zur stabilen Vermehrung des IHNV	Monat 12
<b>Meilenstein 11 (BVT, FLI)</b>	Untersuchung der Zellantwort auf Virusinfektion (qPCR, ELISA, Interferon, iIFAT)	Monat 42
<b>Meilenstein 12 (BVT)</b>	Ermittlung der Inaktivierung von KHV/VHSV- mit verschiedenen Proteasen unter verschiedenen umweltrelevanten Parametern: Temp., pH, Proteinkonzentration, Infektiosität der Erreger	Monat 42
<b>Meilenstein 13 (BVT)</b>	Ermittlung der Inaktivierung von IHNV mit Proteasen unter definierten Umweltbedingungen	Monat 36
<b>Meilenstein 14 (BVT)</b>	Untersuchung der Virusinaktivierung mit Proteasen in sterilen Teichwässern	Monat 42

<b>Arbeitspaket 3: Untersuchung des Einflusses der Proteasen auf Fische und Krankheitsbekämpfung</b>		
<b>Meilenstein 15 (FLI)</b>	Vorversuche – Aquariendesinfektion mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Desinfektionsmitteln, geprüft für die Aquakultur im Vergleich zur Reaktion nach Inaktivierung mit Proteasen	Monat 6
<b>Meilenstein 16 (FLI &amp; BVT)</b>	Untersuchung der Toxizität der Proteasen auf weitere Zelllinien	Monat 24
<b>Meilenstein 17 (FLI)</b>	Aquarien-Desinfektionsversuche (ohne Sediment) mit Fischen (Karpfen, Forellen) ohne Infektion	Monat 40
<b>Meilenstein 18 (FLI)</b>	Aquarien-Desinfektionsversuche (mit Sediment) mit Fischen ohne Infektion	Monat 40
<b>Meilenstein 19 (FLI)</b>	Molekulare Charakterisierung der Targetfische und deren Erreger	Monat 38
<b>Meilenstein 20 (FLI)</b>	Untersuchungen der Proteasen-Verträglichkeit der Zielfische	Monat 41
<b>Meilenstein 21 (FLI)</b>	Untersuchung des Desinfektionsverfahrens mit Fischen in Becken	Monat 41
<b>Arbeitspaket 4: Umsetzung in die Praxis</b>		
<b>Meilenstein 22 (Lfl)</b>	Messung von Boden- und Wasserparametern. Weitergabe von Proben bzw. Werten an die Projektpartner.	Monat 24

<b>Meilenstein 23 (Lfl)</b>	Toxikologische Untersuchungen des Einflusses von Proteasen auf Zoo- und Phytoplankton in Aquarien	Monat 18
<b>Meilenstein 24 (Lfl)</b>	Untersuchung der Auswirkungen von Proteasenanwendung auf Sedimentorganismen	Monat 24
<b>Meilenstein 25 (Lfl)</b>	Rechtliche Prüfung der Ausbringung ins Wasser bzw. den Teichboden.	Monat 42
<b>Meilenstein 26 (Lfl)</b>	Ausarbeiten und Durchführen der Umfragen bei den Teichwirten in Hinsicht auf deren Meinung zur Anwendung von Proteasen zur Desinfektion	Monat 24
<b>Meilenstein 27 (Lfl)</b>	Auswertung der Umfragen zur Anwendung von Proteasen	Monat 36
<b>Meilenstein 28 (Lfl)</b>	Ausbringung der Proteasen in Teichparzellen und Stabilitätsuntersuchungen	Monat 30
<b>Meilenstein 29 (Lfl)</b>	Bewertung des Einflusses von Proteasen auf teichwirtschaftliche Produktionsparameter	Monat 40
<b>Meilenstein 30 (Lfl)</b>	Ökonomische Bewertung der Maßnahmen	Monat 40
<b>Meilenstein 31 (Lfl)</b>	Mitwirkung beim Schlussbericht	Monat 42
<b>Meilenstein 32 (Lfl)</b>	Erstellen von Empfehlungen für die Praxis	Monat 42

**Tabelle 1.** Meilensteinplanung



## 2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

### 2.1 Fischvirosen

Mit steigender Bedeutung der Aquakultur gewinnen auch Maßnahmen zur Bekämpfung von Fischviren, die immer wieder für hohe wirtschaftliche Verluste verantwortlich sind, zunehmend an Bedeutung. Dabei sind in Deutschland vor allem drei Erreger in Hinsicht auf die traditionelle Fischzucht (Karpfen, Forellen) relevant: das Cyprinid Herpesvirus 3 (auch Koi-Herpesvirus oder KHV genannt), das Virale Hämorrhagische Septikämie Virus (VHSV) und das Virus der Infektiösen Hämato-poetischen Nekrose (IHN). Obwohl alle drei Erreger der Erkrankungen anzeigepflichtig sind, existieren bis heute keine einheitlichen Richtlinien für Desinfektionsmaßnahmen von Teichanlagen nach dem Ausbruch der durch diese Viren ausgelösten Krankheiten. Im Folgenden werden die drei Pathogene und deren Charakteristika in Kürze beschrieben.

#### 2.1.1 Cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3, Koi-Herpesvirus, KHV)

Das Cyprinid Herpesvirus 3 oder auch Koi-Herpesvirus (KHV) gehört zu den problematischsten Erregern der Cypriniden (Neukirch *et al.* 1999). Durch sehr hohe Mortalitätsraten kann es sehr hohe ökonomische Verluste verursachen (Perelberg *et al.* 2005). Das Virus ist ein umhülltes DNA-Virus mit einem für Herpesviren ungewöhnlich großen Genom von 295 kbp (Aoki *et al.* 2007). Der Erreger kann über kranke Fische, kontaminierte Werkzeuge, Wasser oder andere Teichbewohner übertragen werden (Minamoto *et al.*, 2011). Obwohl bis jetzt eine KHV-Infektion mit klinischen Symptomen nur bei Karpfen dokumentiert wurde, werden auch andere Fischarten und aquatische Organismen als Überträger verdächtigt (Bergmann *et al.* 2010a, Kielpinski *et al.*, 2010).

#### 2.1.2 Virale Hämorrhagische Septikämie Virus (VHSV)

Das VHSV ist ein umhülltes, einsträngiges RNA-Virus negativer Orientierung mit einem etwa 11 bis 12 kbp großen Genom, das zur Familie der Rhabdoviren gehört (Schütze *et al.*, 1995). Es befällt hauptsächlich Forellenartige, kann aber auch als Genotyp IVb bei 70 anderen Fischarten zu einer tödlichen Erkrankung führen (OIE 2011). Im Falle einer festgestellten VHS konzentrieren sich die Maßnahmen auf die Bekämpfung und die Verhinderung einer weiteren Ausbreitung des Erregers, was im Grunde die Bestandsperre, Tötung der erkrankten oder seuchenverdächtigen Tiere sowie die Errichtung einer Sperrzone bedeutet (FLI, 2013). Die Stabilität des Virus in reinem Wasser kann mehrere Tage betragen (Licek *et al.* 2011).

#### 2.1.3 Infektiöse Hämato-poetische Nekrose Virus (IHNV)

Das IHNV gehört, wie das VHSV, zu den *Rhabdoviridae* und befällt Salmoniden im Salz-, Brack- als auch im Süßwasser. Akute Ausbrüche führen vor allem bei Jungfischen ebenfalls zu sehr hohen Sterberaten, die große ökonomische Auswirkungen haben können. Das Genom besteht aus einer negativ orientierten Einzelstrang-RNA von ca. 11 kbp, die für 6 Proteine kodiert. Zu den Reservoiren des Erregers gehören erkrankte Fische und andere Trägerorganismen (See *et al.* 1999). Zu den Bekämpfungs- und Präventions-Maßnahmen gehören vor allem die Vermeidung des Kontakts mit erkrankten Tieren, als auch die Kontrolle der Bestände und Desinfektionsmaßnahmen (Winton 1991). Obwohl bei atlantischen Aquakulturen von Forellen DNA-Impfstoffe in Kanada und den USA zugelassen wurden, ist deren Nutzung in anderen Ländern nicht lizenziert (*Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals* 2012).

#### 2.1.4 Virus der Infektiösen Pankreasnekrose (IPNV)

Das IPNV wird taxonomisch in die Familie *Birnaviridae* (bi RNA) eingeordnet. Es besitzt ein doppelsträngiges segmentiertes (Segment A und Segment B) RNA-Genom negativer Polarität. Das Genom variiert zwischen u.a. 5870 bp bis zu 5888 bp je nach Isolat oder Genotyp in der Größe. Das IPNV ist weltweit verbreitet und befällt sowohl Süßwasser-, Brack- als auch Salzwasserfische. Es stellt vor allem für Jungfische mit Mortalitätsraten bis zu 100% eine Gefahr dar. Das Virus kann in infizierten Fischen jahrelang persistieren und wiederholt ausgeschieden werden. Es kann über mindestens acht Monate im freien Wasser infektiös sein. Die Übertragung erfolgt zumeist schon über Sexualprodukte von den Elterntieren auf die Eier. Aber auch über das Wasser, Prädatoren und kontaminierte Geräte sowie über Futter kann das Virus in die Bestände eingeschleppt und verbreitet werden. Eine Immunisierung per Injektion wird bisher nur in Norwegen bei Lachsen gegen das Isolat N1 des IPNV vorgenommen.

### 2.2 Kontrolle und Bekämpfung der anzeigepflichtigen Tierseuchen

Der Umgang mit den anzeigepflichtigen Tierseuchen wird in Deutschland durch das Gesetz zur Vorbeugung und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG vom 22. Mai 2013, BGBl. I S. 1324) geregelt. Dabei werden die Vorbeugung und Bekämpfung inklusive der Mittel und Verfahren zur Desinfektion und besondere Schutzmittel, wie z.B. Monitoring der Tierseuchen, beschrieben. Besteht ein Verdacht des Ausbruchs einer solchen Krankheit, muss eine Anzeige bei dem zuständigen Amtstierarzt erfolgen. Der Tierarzt kann dann die nötigen Untersuchungen zur Prüfung des Verdachts mit staatlich anerkannten Methoden und den notwendigen Tierseuchenkontroll-Maßnahmen laut Fischseuchen-Verordnung (FischSeuchV 2008, EU-Richtlinie 206/88/EG) veranlassen. Dabei sollten die betroffenen Bestände isoliert werden, um die Verbreitung der Krankheit zu verhindern. Das heißt, es darf keine Fischumsetzung in den/aus dem Teich erfolgen, es müssen separate Geräte und Schutzbekleidung für die Arbeiten bereitgestellt werden und wenn möglich, sollte die Wasserleitung zu den anderen Teichen unterbrochen werden. Der Amtsarzt kann auch die Desinfektionsmaßnahmen vorschlagen. Leider wurden bis heute noch keine einheitlichen Vorgaben bzgl. der Desinfektion in Deutschland festgelegt. Diese werden für die einzelnen Bundesländer, häufig noch als Empfehlungen, vorgegeben. So wird z.B. in Mecklenburg-Vorpommern Bestandsaustausch und Desinfektion vor Neubesatz vorgeschlagen. Die Teiche sollten trockengelegt und einer Kalkung unterzogen werden. Kann die Trockenlegung nicht erfolgen, sollten die Teiche/Anlage mind. 3 Monate fischfrei gehalten und Branntkalk oder Kalkstickstoff auf die Wasserfläche ausgebracht werden, um den pH-Wert >12 für über drei Tage aufrecht zu halten (Merkblatt zur Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen, Tierseuchenbekämpfung Mecklenburg-Vorpommern, 2007). Für die Sanierung nach einem VHS- bzw. IHN-Ausbruch wird auch die Desinfektion durch Reinigung der Geräte, Leitungen, Maschinen, durch Trockenlegung und Kalkung (0,5-1 kg/m<sup>2</sup> oder /m<sup>3</sup> bis pH 12) der Teiche empfohlen (Baur und Rapp 2003). Da die Empfehlungen hauptsächlich auf empirischen Daten basieren, sind weitere Forschungsaktivitäten notwendig, um die geeigneten, umweltfreundlichen Desinfektionsverfahren für die Anwendung in der Aquakultur zu finden.

### 2.3 Proteasen

Proteasen sind Enzyme, zu deren katalytischen Aufgaben der Verdau von Proteinen gehört. Sie sind einerseits weit verbreitet und können sowohl in lebenden Organismen gefunden werden, wo sie für



das Wachstum und die Differenzierung essentiell sind, als auch von den lebenden Organismen als sogenannte extrazelluläre Proteasen freigesetzt werden. Letztere finden Anwendung in vielen industriellen Bereichen, insbesondere in Waschmittelformulierungen; nach Rao *et al.* (1998) werden beispielsweise ungefähr 25 % des gesamten weltweiten Verkaufs an Enzyme als Proteasen in Waschmitteln eingesetzt. Zu den bekanntesten, kommerziell erhältlichen Proteasen gehören: Subtilisin Carlsberg, Subtilisin BPN', Savinase, Durazym, Maxafem und Purafect (Gupta *et al.* 2002). Diese Enzyme können sich sehr stark in Hinsicht auf Ihre katalytische Aktivität, Substratspezifität, Stabilität und Herstellungskosten unterscheiden, weshalb für spezifische Anwendungen immer eine geeignete Formulierung gefunden werden muss. Die Anwendung handelsüblicher Proteasen in der Lebensmittelindustrie ist in Deutschland in verschiedenen Bereichen zugelassen. Dazu gehören unter anderem die Nutzung als Backenzym zur Verbesserung der Teigführung, bei der Gewinnung von Würzen und Aromen aus pflanzlichen/tierischen Proteinen, zur Verbesserung der Fleischkonsistenz bei Fischprodukten, zur Herstellung von hypoallergener Nahrung, Reinigung von Ultrafiltrationsmembranen, als Futterzusatz oder in Waschformulierungen (Regula *et al.* 2014). Die Verwendung von Enzymen als Zusatzstoffe ist in der EU gesetzlich geregelt. Besondere Anforderungen für mit Hilfe von gentechnisch veränderten Mikroorganismen hergestellte Enzyme gibt es nicht. Die Nutzung von Enzymen als Verarbeitungshilfsstoffe ist nur auf nationalstaatlicher Ebene in Frankreich, Dänemark, Ungarn und Polen geregelt. Nach der derzeitigen Regelung mussten daher nur zwei von mehr als 200 Lebensmittelenzymen ein verbindliches EU-Zulassungsverfahren durchlaufen (Broschüre: Lebensmittelenzyme in der EU, 2012).

Darüber hinaus sind Proteasen aufgrund ihrer Beteiligung beim Lebenszyklus von Pathogenen in der letzten Zeit in den Fokus der Forschung gerückt, die sich mit der Entwicklung von therapeutischen Mitteln gegen Erkrankungen wie Krebs oder AIDS beschäftigen (Sawant *et al.* 2014).

Zum jetzigen Zeitpunkt werden Proteasen in der Aquakultur nur als Zusatzstoffe von Futtermitteln eingesetzt. Die rechtlichen Rahmenbedingungen bei Ausbringung als Desinfektionsmittel sind hier zu prüfen. Dabei stellt sich die Frage nach den rechtlichen Grundlagen bei der Ausbringung auf den Teichboden im abgelassenen Teich sowie bei der Ausbringung ins Wasser. Gemäß dem Bayerischen Wassergesetz (Art 19.) „bedarf das Einbringen von Stoffen in oberirdische Gewässer zu Zwecken der Fischerei keiner Erlaubnis, wenn dadurch keine signifikanten Auswirkungen auf den Gewässerzustand zu erwarten sind“. Aufgrund dessen besteht als eine der wichtigsten Aufgaben in dem hier vorgestellten Projekt die Abschätzung des Einflusses von Proteasen auf die Wasserqualität und Fischgesundheit, wenn sie für die Teichdesinfektion eingesetzt werden. Es soll gezeigt werden, in welchem Rahmen die verwendeten Proteasen die in Teichwasser und Sedimenten enthaltenen Viruspartikel inaktivieren können, und ob sie anschließend auch selbst innerhalb kürzester Zeit (z.B. 24 h) abgebaut werden, damit keine signifikanten Auswirkungen auf den Gewässerzustand zu erwarten sind. Zudem sind die zuständigen Stellen des Bundes oder auch der Bundesländer bezüglich der rechtlichen Bestimmung der vorgesehenen Präparate hinsichtlich der Ausbringung auf den Teichboden bzw. ins Wasser rechtlich zu befragen. Klärungsbedarf besteht ebenso bei der Frage der Zuordnung der Proteasen als Düngemittel, Bodenhilfsstoff oder als Pflanzenschutzmittel. Durch den Einsatz der Proteasen sind durch einen möglichen beschleunigten Abbau von organischer Substanz auch ein düngender Effekt und somit positive Effekte auf die Entwicklung der Naturnahrung und daher der Teichfruchtbarkeit möglich. Zusätzlich muss herausgefunden werden, bis zu welchen Konzentrationen der Einsatz von Proteasen für die Desinfektion noch möglich ist, ohne negative Auswirkung auf die im Wasser verbleibenden Fische zu haben. Sollte sich herausstellen, dass die Sanierungsmaßnahmen mit Proteasen ohne Abfischen nicht durchführbar sind, besteht immer noch die Möglichkeit, diese nach

der Entfernung des Teichbesatzes durchzuführen, falls zu erwarten ist, dass die Proteasen nach der Desinfektionsmaßnahme schnell und vollständig biologisch abgebaut werden.

### 2.3.1 Neutrase

Die im bisherigen Forschungsvorhaben („Maßnahmen gegen Virose in der ökologischen Aquakultur“ (Adam Mletzko, Martin Oberle, FKZ: 2810OE053, 2014) untersuchte Protease – Neutrase® – ist ein Produkt des Bakterium *Bacillus subtilis*, welches hauptsächlich bei Brau- oder Backverfahren Anwendung findet, wo sie zum Verstärken von natürlichen Malzproteasen bzw. zum Aufweichen von Gluten aus Weizen genutzt wird. Das Optimum ihrer Aktivität liegt dabei zwischen 45-55 °C und pH 5,5-7,5. Toxikologische Untersuchungen liegen für Menschen (letale Dosis bei oraler Aufnahme, LC<sub>50</sub> >2000 mg/kg Körpergewicht), Daphnien (die mittlere effektive Konzentration, EC<sub>50</sub> = 3,24 aktives Enzymprotein (aep)/L), Algen (mittlere Hemmkonzentration der Wachstumsrate ErC<sub>50</sub> = 0,5 mg aep/L) und Fische (LD<sub>50</sub> > 18,5 mg aep/L) vor. Ebenso ist bekannt, dass die Protease in der Umwelt leicht abbaubar ist und kein bioakkumulatives Potenzial besitzt (Neutrase 0.8 L MSDS). Die Untersuchungen von Swisher (1996) zeigten, dass die Inkubation von Detergenzproteasen in Flusswasser bereits nach einem Tag zur Reduktion deren Aktivität bis zu 97 % führt.

### 2.3.2 Subtilisin

Subtilisin (auch unter den Handelsmarken Savinase, Purafect, Maxafem oder Durazym verkauft) sind proteolytische Enzyme bakterieller Herkunft, die hauptsächlich in Detergenzien und Haushaltsreinigungsprodukten benutzt werden. Die Gesamtmenge, die in der EU im Jahr 2002 hergestellt wurden, betrug ca. 1.000 Tonnen des reinen Enzyms. Diese Proteasen zeigen ihre Aktivität bei pH-Werten zwischen 6 und 11, wobei die höchste Aktivität zwischen pH 9 und 11 auftritt. Sie sind sehr gut wasserlöslich, zeichnen sich jedoch durch eine relativ niedrige Stabilität im Wasser aus, was sich wiederum in einem sehr schnellen Abbau in der Umwelt widerspiegelt. Diese Enzyme werden selbst bereits bei den Waschvorgängen bis zu 80 % inaktiviert und bis zu 99 % bei der Behandlung des Abwassers in den Kläranlagen aus dem Wasser entfernt. Die EC<sub>50</sub>-Werte für Subtilisin in aquatischer Umgebung schwanken zwischen 0,1 und 50 mg aep/L und basieren auf Ergebnissen des *Human and Environmental Risk Assessment* (HERA). Für dieses Enzym besteht keinerlei Umweltrisiko für alle Umweltbereiche. Das einzige gesundheitliche Problem, welches für Menschen identifiziert wurde, ist die Möglichkeit einer allergischen Reaktion nach dem Einatmen des Enzyms (HERA, Risk Assessment).

Alcalase® ist ein flüssiges Produkt der Firma Novozym, das zur Familie der Subtilisine gehört (vorwiegend Subtilisin A enthält) und mit Hilfe von *Bacillus licheniformis* hergestellt wird. Neben der Hydrolyse interner Peptidbindungen katalysiert diese Serin-Endoprotease die stereoselektive Hydrolyse von Esterbindungen inklusive der heterozyklischen Aminoester. Laut Hersteller liegt das Optimum des Enzyms bei pH 7 bis 9 und zwischen 30 und 65 °C, es ist einfach biologisch abbaubar und hat keine Neigung zur Bioakkumulation. Alcalase® ist im Lebensmittelbereich zugelassen und findet breite biotechnologische Anwendung. Enzymatische Hydrolyse von Proteinen in verschiedenen Matrizen mit Hilfe von Alcalase®, vorwiegend für die Verarbeitung von Abfallprodukten für eine weitere Verwertung z.B. im Tierfutter, ist bereits in der Literatur beschrieben (Adamson & Reynolds 1996; Guerard *et al.* 2001; See *et al.* 2011; Muzaiifa *et al.* 2012; Ramakrishnan *et al.* 2013). Nichtsdestotrotz wurde über eine Nutzung des Enzyms zur Desinfektionszwecken bisher nicht berichtet.

### 2.3.4 Papain (native Protease)

Als Protease aus nativer Quelle wurde in dieser Arbeit Papain aus *Carica papaya L.* ausgesucht. Pflanzliche Genome enthalten eine Vielzahl von Sequenzen, die verschiedene Proteasen aus

unterschiedlichen Familien kodieren und ebenfalls multiple biologische Funktionen übernehmen. Wie auch bei anderen Organismen nutzen Pflanzen die Proteasen, um nicht funktionale Proteine in einzelne Aminosäuren zu spalten, die im Anschluss wiederverwertet werden. Daneben spielen die Proteasen eine wichtige regulative Rolle bei allen lebenden Organismen (van der Hoorn 2008).

Papain gehört zu den Cysteinproteasen und kommt in relativ hoher Konzentration in der noch grünlichen Schale und den Kernen von Papayas vor. Das Potential von Papain oder des Papaya-Saftes, welcher dieses Enzym enthält, z.B. zur Reinigung von Wunden, wurde bereits im XVIII Jahrhundert entdeckt (Müller-Jahncke & Friedrich). Auch in der aktuellen Literatur ist Papain als phytotherapeutisches Mittel mit antioxidativen Eigenschaften zu finden (Silva *et al.* 2007 and 2010). Darüber hinaus findet Papain seine Anwendung in der Lebensmittel- (z.B. als Fleischzartmacher, bei Weinherstellung) oder in der Kosmetikindustrie (Silva *et al.* 2007, Krishna *et al.* 2008).

## 2.4 Vorarbeiten der Antragsteller

In dem abgeschlossenen Kooperationsprojekt: „Maßnahmen gegen Virosen in der ökologischen Aquakulturen“ (FKZ: 2810OE053, BVT, LfL, LGL) wurden unterschiedliche Desinfektionsverfahren zur Inaktivierung von KHV und VHSV in wässrigen Lösungen und Sedimenten untersucht. Da sich das KHV in den Zellkulturen bisher nur mit mäßigem Erfolg vermehren ließ, musste zuerst die *in vitro* Replikation des Virus optimiert werden, um die Durchführung der Inaktivierungsversuche ohne vorherige Aufkonzentrierung des KHV zu ermöglichen. Dieses Vorhaben wurde erfolgreich abgeschlossen und führte routinemäßig zu einem Virustiter von  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL. Neben den Standard-Desinfektionsreagenzien wie Branntkalk oder Peressigsäure wurde auch zum ersten Mal die Nutzung kommerziell verfügbarer Proteasen – Neutrasen – zur Inaktivierung der zwei oben genannten Viren untersucht. Durch dieses Projekt wurde nicht nur eine erfolgreiche Zusammenarbeit zwischen den drei von vier Antragstellern etabliert, sondern auch das hohe Potenzial der Proteasen für ihre Anwendung als Desinfektionsmittel für Fischviren erkannt.

Ferner wurde in einem weiteren Projekt, welches am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der FAU Busan, Südkorea in Kooperation mit Dr. habil. Sven Bergmann, FLI und dem BVT, FAU Erlangen durchgeführt wurde, eine ebenso erfolgreiche Zusammenarbeit zwischen BVT und FLI demonstriert. Die in diesem Projekt beim FLI durchgeführten Tierversuche haben in entscheidendem Maße zur Entwicklung einer innovativen Maßnahme zur Prävention/Bekämpfung von KHV-Infektionen beigetragen (Patent in Vorbereitung).

## 3. Material und Methoden

### **Wasserparameter und Wasserproben**

In Rahmen der Untersuchungen wurden unter Einbeziehung der Daten eines parallel verlaufenden Projektes (Oberle *et al.* 2019b) von Mai bis September 2016 zahlreiche Wasserproben aus insgesamt 12 Teichen im Aischgrund, zusätzlich 30 Teichparzellen im Aischgrund sowie von 6 Teichen in der Oberpfalz hinsichtlich wichtiger Parameter der Wasserqualität untersucht. *In situ* erfolgte die Messung von Sauerstoff und Temperatur mit dem WTW Multiméter (Multi 3410, Weilheim, Germany) und die Messung des pH-Wertes mit dem WTW pH-meter (3110, Weilheim, Germany). Dabei wurde die Temperatur und Sauerstoffkonzentration an der Wasseroberfläche (20 cm Wassertiefe) sowie bodennah (80 cm Wassertiefe) ermittelt. Die Ammoniumkonzentration (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (MColorTest™ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurde semiquantitativ gemessen (kolorimetrisches Verfahren nach Nessler). Mischproben wurden aus fünf bzw. vier verschiedenen Stellen der Teiche bzw. Teichparzellen

(Wassertiefe zwischen 30 und 40 cm) unter Verwendung eines 1 L-Teleskop-Wasserprobennehmers (Winlab) gewonnen.

### ***Untersuchung der Qualität der Teichböden und der mikrobiellen Aktivität sowie Stabilitätsuntersuchungen bei Ausbringung von Proteasen***

Bodenproben wurden aus gefüllten Teichen bzw. Teichparzellen in verschiedenen Teilen Bayerns (hauptsächlich Aischgrund und Oberpfalz) von Juni bis August 2016 entnommen. Sie wurden unter Verwendung eines Ekman-Bodengreifers (225 cm<sup>2</sup>) von zufällig ausgewählten Stellen gesammelt (Abb. 1) und eine Mischprobe für jeden Teich bzw. jede Teichparzelle hergestellt. Alle Mischproben wurden in Plastikbeuteln bei -20 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Untersucht wurden die Parameter pH-Wert, Gesamtkohlenstoff (C<sub>t</sub>), Organischer Gesamtkohlenstoff (C<sub>org</sub>), Gesamtstickstoff (N<sub>t</sub>), Humusqualität (C<sub>t</sub>/N<sub>t</sub>), pflanzenverfügbare Phosphor (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CAL) und Gesamt-Phosphat (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Die Schlamm- und Sedimentproben wurden nach dem Auftauen in feuchtem Zustand auf 2 mm gesiebt, wobei größere organische Bestandteile bereits vor dem Sieben aussortiert wurden. Die gesiebten Proben wurde bei 40 °C für 1-2 Tage getrocknet und anschließend auf 0,5 mm gemahlen. Die Gesamtkohlenstoff-Gehalte (C<sub>t</sub>) und Gesamtstickstoff-Gehalte (N<sub>t</sub>) wurden mit einem CN-Analysator (Vario-EL Cube, Elementar, Deutschland) nach trockener Verbrennung bei 1000 °C bestimmt. Die Carbonat-C-Bestimmung (C<sub>anorg</sub>) erfolgte gasvolumetrisch nach Scheibler. Durch das Bilden der Differenz von C<sub>t</sub> und C<sub>anorg</sub> wurde der organische Kohlenstoff-Gehalt (C<sub>org</sub>) ermittelt. Der pH-Wert des Bodens wurde in 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung in einem Boden-Lösungsverhältnis von 1:25 (g/ml) gemessen.



**Abb. 1.** Entnahme von Bodenproben aus gefüllten Teichparzellen mit dem Ekman-Bodengreifer.

Die mikrobielle Aktivität wurde anhand des Katalase-Tests nach Beck (1971) mit Anpassungen durchgeführt. Das Enzym Katalase spaltet toxisch wirkendes Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff und dient so den Mikroorganismen zur „Entgiftung“. Nach einer Einstellung der

Bodenproben auf pH-Werte zwischen 6-7 wurde Wasserstoffperoxid zugegeben. Der in 3 Minuten abgespaltene Sauerstoff wurde manometrisch bestimmt.

Die mikrobielle Biomasse wurde mit der Substratinduzierten Respiration (SIR) nach Heinemeyer *et al.* (1989) bestimmt. Die SIR von Mikroorganismen beruht auf einer sofort einsetzenden, verstärkten Atmung (CO<sub>2</sub>-Abgabe) von Mikroorganismen bei der Zugabe von Glukose – einer leicht verfügbaren Kohlenstoffquelle. Durch die SIR-Methode erfolgt eine indirekte Bestimmung der aktiven mikrobiellen Biomasse in Böden (Anderson und Domsch, 1978) unter Verwendung eines Infrarot-Gasanalysators (ADC Modell 225 MK3, England) nach Heinemeyer *et al.* (1989). Je 50 g Probe wurde in 23 Acrylglaszylinder zwischen zwei luftdurchlässigen Schaumstoff-Stopfen eingewogen und in der Anlage angeschlossen. Ein Acrylglaszylinder blieb leer und diente als Kontrolle (Blindwert). Mit einer Umschaltfrequenz von 2,5 min kann eine stündliche Messung aller 24 Acrylglaszylinder erfolgen. Nach 24 h Vorinkubation, werden die Proben bei 22 °C mit Umgebungsluft durchströmt. Nach Zugabe von 0,2 g Glucose wird mit dem IR-Gasanalysator kontinuierlich die CO<sub>2</sub>-Konzentration der Probenluft mit der Außenluft verglichen. Die CO<sub>2</sub>-Produktionsrate wird unter Berücksichtigung der Gasdurchflussrate (ml/min) und der Bodeneinwaage (in g) berechnet (in µg CO<sub>2</sub>/g/h). Die CO<sub>2</sub>-Konzentration ist proportional zur mikrobiellen Biomasse (in µg C/g) (Anderson and Domsch, 1978) und wird mit einem Konversionsfaktor von CO<sub>2</sub>-Produktion zu Biomasse C von f=30 berechnet. Der Quotient aus mikrobiellem und organischem Kohlenstoffgehalt des Bodens ( $C_{mic}/C_{org}$ ) ist ein ökophysiologischer Parameter, der Aussagen über die C-Dynamik im Boden erlaubt. Es wurde die automatische Feuchtigkeitsbestimmung von pflanzlichen Produkten, Getreideprodukten und getrockneten Behälterinhalten der Bioenergie mittels Anwendung thermographischer Prinzipien angewandt. Dies erlaubt die automatische Endpunkt-Bestimmung und Kontrolle während des ganzen Trocknungsprozesses. Die Bestimmung erfolgt für Substrate bei denen nur ein geringer Anteil flüchtiger Bestandteile zu erwarten ist. Die entsprechende DIN-Norm, bzw. Messvorschrift ist: „Bestimmung der Trockensubstanz und der organischen Trockensubstanz“; Messmethoden-sammlung Biogas; 2. Auflage - 2013; Kapitel 3.1; Seite 23.

Die Untersuchungen im Hinblick auf die Auswirkungen von Proteasen auf die Mikroorganismen im Teichboden wurden in Versuchsgefäßen mit jeweils 5 l Volumen durchgeführt. Der Teichboden wurde an zufällig ausgewählten Stellen im Teich unter Verwendung des Ekman-Bodengreifers (225 cm<sup>2</sup>) entnommen. Frischer Teichboden wurde homogenisiert und die Trockensubstanz bestimmt. Danach wurden 3.000 g Boden in jedes Versuchsgefäß gegeben, was eine Schichthöhe von 10,3 ± 0,1 des Sediments ergab. Es wurden drei Gruppen gebildet. Eine blieb als Kontrollgruppe ohne die Anwendung eines Enzyms. In den anderen beiden Gruppen wurden die Enzyme gleichermaßen auf die Oberfläche gesprüht. Die gewählte Menge wurde aus den Versuchen beim Projektpartner an der FAU für beide Enzyme abgeleitet (Titerreduktion über 3-Potenzen). Die Menge von 205 mg<sub>Enzymlösung</sub> Alcalase (Titerreduktion über 3-Potenzen; ≈ 100 mg<sub>Enzymlösung</sub>/l) und die Menge von 11,0 g<sub>Enzymlösung</sub> Neutrase (Titerreduktion über 3-Potenzen; ≈ 5500 mg<sub>Enzymlösung</sub>/l) wurden mit destilliertem Wasser zu einer Gesamtmenge von 10 ml Lösung gemischt und gleichermaßen auf die Teichbodenoberfläche in den Versuchsgefäßen verteilt. Alle Behandlungen wurden dreifach durchgeführt. Die Versuchsgefäße wurden zur Analyse ans Bodenlabor der LfL nach Freising transportiert. Die Böden wurden zum Zeitpunkt 0, nach 24 h und nach einem Monat bezüglich Trockensubstanz, pH-Wert, mikrobieller Aktivität und Biomasse untersucht. Die Versuchsgefäße standen während des Untersuchungszeitraumes im Freien bei natürlicher Beleuchtung. Die Stabilität von Proteasen in verschiedenen Gewässern wurde in Zusammenarbeit mit unserem Partner (FAU) bereits untersucht.

### **Verwendete Proteaseformulierungen**

Alle vier in der Studie verwendeten Protease-Formulierungen wurden von Sigma-Aldrich erworben:

- 1) Neutrase® - von *Bacillus amyloliquefaciens*, Hersteller: Novozym, Suspension mit einer nominalen proteolytischen Aktivität von respektive  $\geq 0,8$  U/g
- 2) Alcalase® - von *Bacillus licheniformis*, Hersteller: Novozym, Suspension mit einer nominalen proteolytischen Aktivität von respektive  $\geq 2,4$  U/g
- 3) Subtilisin - von *Bacillus licheniformis*, Hersteller Sigma-Aldrich, Pulver mit  $\geq 2,4$  U/g proteolytischen Aktivität
- 4) Papain - aus *Carica papaya*, Hersteller: Roche, Suspension mit spezifischer Aktivität von 45 U/mg (BAEE-Assay bei 25°C) Protein und 15 mg Protein per ml.

Nach dem Öffnen wurden die Produkte bei 8 °C im Kühlschrank gelagert.

### **Zelllinien und Virusstocks**

Für die Versuche wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet, die alle vom Friedrich-Löffler-Institut (FLI, Insel Riems) bereitgestellt wurden. Die Kultivierung aller Zellen fand in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit 4,5 g/l Glukose, 25 mM HEPES, 0,5 mM NaHCO<sub>3</sub> und 9 % (v/w) Fetalem Kälber Serum (FKS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) statt.

*Common Carp Brain* (CCB Zellen) sind adhärente, fibroblastenähnliche Zellen, die aus dem Gehirn des Karpfens (*Cyprinus carpio*) gewonnen und von Neukirch (1999) in Hannover etabliert wurden. Unter anderem ist diese Zelllinie gegenüber KHV empfänglich. Die CCB Zellen (CCLV-RIE 816) mit der Lot Nummer 4223 befanden sich bei Erhalt in Passage 83.

*RTG-2 Zellen* oder *Rainbow Trout (False)* (RT/F) Zellen sind morphologisch gesehen fibroblastenähnliche Zellen, die ursprünglich fälschlicherweise als Zellen aus der Keimdrüse der Regenbogenforelle (RTG) deklariert wurden. Später wurden die Zellen mit Hilfe der PCR-Analyse dem Blauen Sonnenbarsch (*Lepomis macrochirus*) zugeordnet (Schütze 2011). Diese Zelllinie weist eine Empfänglichkeit sowohl gegenüber VHSV als auch gegenüber IHNV und IPNV auf. In diesen Vorhaben wurde die Zelllinie für die Herstellung des Virusstocks von VHSV sowie für die Bestimmung des Titers dieses Virus benutzt. Die verwendeten RTG-2 Zellen (CCLV-RIE 88) wurden in Passage 131 von FLI bereitgestellt.

*Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) Zellen mit der Lot Nummer 3241 und Katalognummer CCLV-RIE 173 wurden ebenfalls vom FLI bezogen, und zur Herstellung von IHNV-Stock sowie zur Bestimmung dessen Titers herangezogen. Diese epithelartigen Zellen stammen aus der Spezies der Fettkopfelritze und nicht wie ursprünglich angenommen aus dem Karpfen (Schütze 2011). Diese Zelllinie weist unter anderem eine Virusempfänglichkeit gegenüber IHNV und VHSV auf.

Das verwendete KHV wurde erstmals von Dr. Peiyu Lee in Taiwan isoliert und von Dr. habil. Sven Bergmann für die Forschungszwecke bereitgestellt. Der Virusstock wurde mit Hilfe von CCB Zellen in DMEM mit 9 % FKS bei 25 °C hergestellt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Konzentration der infektiösen Viruspartikeln wurde über die Endpunkt-Verdünnung (50 % *tissue culture infective dose*, TCID<sub>50</sub>) und statistische Auswertung nach Reed und Muench (1938) bestimmt.

Bei dem verwendeten VHSV handelt es sich um das Isolat Fi13 (Enzmann & Bruchhof 1989), welches aus Regenbogenforellen isoliert wurde. Der verwendete Virusstock wurde mit RTG-2 Zellen in DMEM mit 9 % FKS bei 15 °C hergestellt, aliquotiert und bei - 80 °C gelagert.

Als IHNV wurde das Isolat DF 11/95 isoliert aus einer Regenbogenforelle von Schlotfeld *et al.* (Hannover, Nationales Referenzlabor für Fischkrankheiten am FLI, Insel Riems, nicht veröffentlichte Daten) herangezogen. Der IHNV Virusstock wurde auf EPC Zellen repliziert (DMEM mit 9 % FKS 15 °C) und wurde bei -80 °C aliquotiert gelagert.

Alle für die Untersuchungen hier verwendeten Virusstocks zeigten einen Titer von mindestens  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml.

### **Analytische Methoden zur Auswertung der durchgeführten Versuche**

#### **a) Keimzahlbestimmung**

Zur Keimzahlbestimmung der unsterilen Wasserproben wurde Nährmedium bestehend aus Hefeextrakt (3 g/l), Glucose-Monohydrat (1,1 g/l), Pepton (aus Casein, 1,5 g/l), NaCl (3,85 g/l und Agar 20 g/l) verwendet. Dabei wurden 100 µl der Probe oder eine Verdünnung der Probe in eine Petrischale (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gegeben und circa 10 ml des aufgeschmolzenen Nährmediums dazu gegossen. Nach vorsichtigem Schwenken und Erstarren des Nährmediums wurde die Petrischale mit Parafilm (Bemis, Neenah, USA) verschlossen und bei 25 °C für 7 d inkubiert. Das Ablesen der Petrischalen erfolgte makroskopisch unter Gegenlicht.

#### **b) Virustitration**

Die Virustitration wurde mit Hilfe der Endpunktverdünnungsmethode (TCID<sub>50</sub>-Assay) durchgeführt. Für jedes Virus wurde eine passende Zelllinie eingesetzt. Für das KH Virus wurden CCB Zellen bei 25 °C inkubiert, für VHSV wurden RTG-2 Zellen und für IHNV EPC Zellen bei einer Inkubationstemperatur von 15 °C verwendet.

Zunächst wurden Zellen in einer bestimmten Zelldichte in eine 96-Well Platte ausgesät und 24 h bei 25 °C inkubiert, um so die Anheftung und Ausbreitung der Zellen zu gewährleisten. Die zu untersuchende Probe wurde nach Entfernen des Kulturmediums aus den Wells der Platte in einer Verdünnungsreihe in 10er Potenzen auf die Zellen gegeben, wobei 8 Wells mit je 100 µl pro Verdünnungsstufe befüllt wurden. Die Verdünnungen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß hergestellt in dem 900 µl DMEM + 9 % FKS + 1 % Antibiotikum mit 100 µl der vorherigen Verdünnung gemischt wurden. Dabei entsprach die  $10^0$  Verdünnung der unverdünnten Probe. Die Anzahl an Verdünnungen wurde abhängig vom Starttiter aus der Zahl im Exponenten des Virustiters + 1 bestimmt.

Danach wurden die Platten in regelmäßigen Abständen von 5 d mikroskopisch auf das Auftreten des cytopathischen Effektes (CPE) hin untersucht. Das endgültige Ablesen der Platten erfolgte nach 14 Tagen.

Die statistische Auswertung und quantitative Bestimmung des Virustiters wurde mit Hilfe einer Excel-Datei durchgeführt, die nach der Methode von Reed L. J. & Muench H. (1938) aus der Anzahl der infizierten Wells in den unterschiedlichen Verdünnungsstufen die Berechnung einer Viruskonzentration in der Einheit TCID<sub>50</sub>/ml ermöglicht. Die Nachweisgrenze für diese Methode lag bei 12 TCID<sub>50</sub>/ml, die Bestimmungsgrenze bei 160 TCID<sub>50</sub>/ml. Diese Grenzen wurden durch Vorversuche bestimmt.



### ***Ermittlung der Zelltoxizität verschiedener Proteasen in permanent wachsenden Fischzellkulturen***

Um den Einfluss von Proteasen auf verschiedene Zelllinien, die zu der Vermehrung der Zielviren in diesem Projekt verwendet wurden, zu untersuchen, wurden verschiedene Dosis-Wirkung-Kurven mit den drei ausgesuchten Enzymen: zwei kommerziell verfügbaren - Neutrase<sup>®</sup>, Alcalase<sup>®</sup> - sowie der aus der nativen Quelle (*Carica papaya L.*) stammenden Papain bei verschiedenen Temperaturen mit Hilfe von in 96-Wellplatten durchgeführten MTT-Test aufgenommen. Dafür wurden entsprechende Zellen mit einer definierten Zelldichte in der 96-Wellplatte ausgesät und bei der ausgesuchten Kultivierungstemperatur 24 h vorinkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium (DMEM mit 9 % FKS) abgenommen und durch in Medium vorverdünnte Enzymlösungen (n=6 pro Verdünnungsstufe) ausgetauscht. Nach 48 h Inkubation mit den Proteasen wurde den Überstand abgenommen und mit 100 µl von MTT-Lösung (2:1 mit Medium verdünnt) versetzt. Die Mikrotiterplatte wurde daraufhin erneut für 4 h bei 25 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 3.220 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abziehen der MTT-Lösung aus den Vertiefungen wurde für die Lyse der Zellen jeweils 20 µl Igepal (Nonidet<sup>®</sup> 0,4 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zugegeben und die Platte bei 1.000 rpm für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 180 µl DMSO wurde die Platte erneut geschüttelt und die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 570 nm mit Hilfe eines Plattenlesers (EnSpire, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) gemessen. Als negative Kontrolle (100 % Vitalität) dienten Zellen, die inkubiert ohne Zugabe von Enzymlösung inkubiert wurden. Als positive Kontrolle (0 % Vitalität) wurden die Zellen in entsprechenden Vertiefungen mit 20 % DMSO anstatt der Enzymlösung versetzt. Schließlich wurden die Dosis-Wirkung-Kurven mit Hilfe von Sigma-Plot (Version 11.0) geplottet und basierend darauf die mittlere effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>) für die entsprechende Zelllinie und Protease berechnet.

### ***Bestimmung der Protease-Konzentration zur Inaktivierung von Zielviren und der Titerreduktion bei den ausgesuchten Parametern***

Um die Inaktivierung der Zielviren mit verschiedenen Proteasen und deren Konzentration unter vergleichbaren Laborbedingungen zu untersuchen, wurden Experimente mit dem jeweiligen Virus und Enzym bei 8 und 25 °C durchgeführt. Dafür wurden 900 µl der Virussuspension mit 100 µl in PBS vorverdünnter Protease zusammengemischt und unter Lichtausschluss, bei der entsprechenden Temperatur über 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration von infektiösen Viruspartikeln (TCID<sub>50</sub>/ml) sowie die Kopienzahl der genetischen DNA bzw. RNA der Viren (Kopienzahl bzw. Zyklenzahl über die quantitative Polymerasekettenreaktion, PCR) mit Hilfe von Standardprozeduren bestimmt. Der Starttiter (vor der Behandlung) wurde anhand der Vorverdünnung und des Titers des verwendeten Virusstocks berechnet. Negativkontrollen wurden mit Hilfe des gleichen Virusstocks und einer Verdünnung mit PBS (ohne Enzyme) vorbereitet.

Die Berechnung der Reduktion des Virustiters (T<sub>R</sub>) – basierend auf dem Virustiter vor und nach der Protease-Behandlung – erfolgte gemäß Gleichung 1:

$$T_R = \log_{10} (T_{\text{Start}}) - \log_{10} (T_{\text{End}})$$

Im späteren Verlauf des Projekts wurden weitere Versuche mit gleichem Aufbau, jedoch mit geänderten Parametern durchgeführt, z.B. unter unterschiedlicher Inkubationsdauer, mit veränderten pH-Werte oder Matrix.



### ***Untersuchung der proteolytischen Aktivität der ausgesuchten Enzyme bei verschiedenen Temperaturen, pH-Werten, etc.***

Um die Desinfektion der Zielviren mit den ausgesuchten Proteasen unter verschiedenen Parametern zu testen sowie zu interpretieren, wurde die reale proteolytische Aktivität der ausgesuchten Enzymlösungen unter verschiedenen Bedingungen, wie z.B. Temperaturen, pH-Werten, Matrix, untersucht. Dafür wurde ein kommerziell verfügbares Enzymaktivitätsassay – *Protease assay kit Fluorometric-Red*, Abcam – etabliert und die proteolytische Aktivität der im Projekt benutzten Enzymlösungen in Reinstwasser bei 25 °C (wie bei den Inaktivierungsversuchen) in Relation zur Aktivität von Trypsin bei 37°C bestimmt. Da die Temperatur einen großen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme haben kann, wurde in Folge die proteolytische Aktivität von Neutrase® und Alcalase® bei verschiedenen Temperaturen mit Hilfe des Assays ebenfalls gemessen.

Darüber hinaus wurden die proteolytischen Aktivitäten der beiden Enzymlösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert getestet. Da hier das *Protease assay kit* nicht herangezogen werden konnte (das Assay ist mit verschiedenen pH-Werten nicht kompatibel), wurde stattdessen ein Protokoll basierend auf Serumalbumin (BSA) und Gelelektrophorese (SDS-PAGE) etabliert, um qualitative Aussagen über den Proteinverdau bei verschiedenen Inkubationsparametern zu ermöglichen. Dieses wurde zuerst in Anlehnung an die Versuche zum zeitlichen Verlauf der Virusinaktivierung durchgeführt, um die Vergleichbarkeit mit bereits gesammelten Daten zu sichern. Später wurde das Protokoll auch zur Erhebung von Daten bezüglich der proteolytischen Aktivität der Enzyme unter verschiedenen Temperaturen und pH-Werten herangezogen.

Dafür wurden 2 mg/ml Bovine Serumalbumin (BSA) mit der definierten Menge des zu untersuchenden Enzyms in ausgesuchtem Puffer (z.B. PBS bei pH = 7,4) vermischt und für eine bestimmte Zeit bei ausgewählter Temperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Inkubation abgebrochen, die Proben mit Natriumdodecylsulphat (SDS) bei 95°C denaturiert und zur Trennung über Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf die Gele (MiniPROTEAN TGX Precast Gel 10 %, Biorad) aufgetragen. Nach der Trennung wurden die Proteine im Gel fixiert (3 h EtOH: 5 %ige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1:1) und über Nacht mit kolloidaler Coomassie-Blau-Lösung visualisiert.

### ***Untersuchung der proteolytischen Aktivität der ausgesuchten Proteasen in verschiedenen Wasserproben***

Der Einfluss von Teichwasser auf die Stabilität bzw. die proteolytische Aktivität der Enzyme Neutrase® und Alcalase® bei einer Temperatur von 20 °C wurde bis zu einer Dauer von 14 Tagen untersucht. Um die Auswirkungen der Organismen im Teichwasser auf die Enzyme näher charakterisieren zu können, wurde ein Ansatz der Teichwasserproben filtriert (132 µm Planktonnetz) und größere Lebewesen abgetrennt. Zum Vergleich wurde die Stabilität/Aktivität der verwendeten Enzyme in Leitungswasser (unsteril) und sterilem Medium überprüft. Die Versuche wurden in autoklavierten 250 ml Borosilikatflaschen bei natürlicher Belichtung durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben gezogen und die Aktivität der Enzyme mit Hilfe des *Protease assay kit Fluorometric-Red, Abcam* gemessen.

### **Untersuchung von Stabilität/Infektiosität der Zielviren in verschiedenen sterilen und unsterilen Wasserproben**

Die Stabilitätsuntersuchungen der drei Viren KHV, VHSV und IHNV erfolgten unter Lichtausschluss bei 20 °C in biologischen Triplikaten. In allen Versuchen wurden die Wasserproben und das Medium für mindestens 1 Stunde auf 20 °C vortemperiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Virussuspension mit einem definierten Virustiter. Für KHV wurde der Starttiter auf ungefähr  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml eingestellt, für VHSV und IHNV auf annähernd  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml. Nach Hinzufügen der Virussuspension zu den Proben wurden diese mehrfach mit einer 10-ml Einweg-Pipette aus Polystyrol (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) resuspendiert und anschließend ein Aliquot von 1 ml zur analytischen Untersuchung mittels Virustitration und qPCR (Startpunkt) und ein weiteres Aliquot zur Bestimmung der Keimzahl in den unfiltrierten Wasserproben entnommen.

Die Entnahme der Aliquots erfolgte für die Viren KHV und IHNV innerhalb von 96 h, für VHSV innerhalb von 168 h zu bestimmten Zeitpunkten. Die entnommenen Aliquots wurden bis zur Verwendung für weitere Analysen (Virustitration, qPCR) bei - 80 °C gelagert.

### **Toxikologische Untersuchungen des Einflusses von Proteasen auf Zoo- und Phytoplankton**

Die Toxizitätstests von zwei verschiedenen Proteingemischen (Alcalase® und Neutrase®) wurden für Phytoplankton und Zooplankton gemäß der Richtlinie der OECD durchgeführt. Der 72-h-Wachstumshemmtest (72h-EC<sub>50</sub>-Test) für Algen wurde mit *Desmodesmus subspicatus* gemäß dem OECD-Test (2006) - Fresh Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (OECD 201) - durchgeführt. Sieben Konzentrationen des Enzyms Alcalase® (0, 5, 10, 50, 100, 500 und 1000 mg/l) wurden gewählt. Dabei wurde die jeweilige flüssige Formulierung von Alcalase® verwendet. Auch bezüglich des Enzyms Neutrase® wurde die jeweilige flüssige Formulierung verwendet. Hier wurden sechs Konzentrationen (0, 10, 50, 100, 200 und 500 mg/l) gewählt. Die Ergebnisse für die 72h-EC<sub>50</sub>-Werte wurden unter Anwendung der Probit-Analyse mit der Software EKO-TOX 5.2 berechnet.

Der 48-stündige akute Toxizitätstest von *Daphnia magna* wurde gemäß OECD (2004) durchgeführt (*Daphnia sp.*, Akuter Immobilisierungstest, OECD 202). Acht Konzentrationen des Enzyms Alcalase® (0, 10, 50, 100, 150, 200, 300 und 500 mg/l) wurden gewählt. Dabei wurde die gleiche, oben beschriebene flüssige Formulierung von Alcalase® verwendet. Bezüglich des Enzyms Neutrase® wurden sieben Konzentrationen (0, 100, 200, 300, 350, 400 und 500 mg/l) untersucht. Auch hier wurde die gleiche flüssige Formulierung, wie oben beschrieben, benutzt. Die 48h-EC<sub>50</sub>-Werte wurden unter Anwendung der Probit-Analyse mit der Software EKO-TOX 5.2 berechnet (Abb. 2).



Abb. 2. Toxikologische Untersuchungen des Einflusses von Proteasen auf Phytoplankton (*Desmodesmus subspicatus*)

*D. magna*, eine Art, die häufig in den Teichen vorkommt, ist einer der empfindlichsten Organismen in Toxizitätstests. In dieser Untersuchung wurden ausschließlich weibliche *D. magna* aus einem Versuchsteich des Institutes gewonnen. *D. magna* wurden an die Laborbedingungen angepasst, indem die Versuche erst nach der Entwicklung der 5. Parthenogenese-Population begonnen wurden. Der 48-stündige Akute Toxizitätstest von *D. magna* wurde für beide Enzyme gemäß der OECD (2004) - Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien (*Daphnia sp.*, Akuter Immobilisierungstest), mit geringfügiger Modifikation, durchgeführt. Anstelle von ISO-Standardwasser wurde in diesen Versuchen für die Laborhaltung der *Daphnien* und dem Akuten Toxizitätstest Teichwasser aus dem Versuchsteich des Instituts verwendet. Nach dem Absetzen von Feststoffen und der Temperaturangleichung über 24 h im Labor wurde das Teichwasser durch ein feinmaschiges Netz (132 µm) gesiebt. Der 48-stündige Akute Toxizitätstest für Alcalase® und Neutrase® wurde im September 2017 durchgeführt. Acht Konzentrationen des Enzyms Alcalase® (0, 10, 50, 100, 200, 300, 400 und 500 mg/l) und acht Konzentrationen des Enzyms Neutrase® (0, 10, 50, 100, 200, 400, 800 und 1000 mg/l) wurden gewählt. Dabei wurden jeweils die oben beschriebenen flüssigen Formulierungen von Alcalase® und Neutrase® verwendet. Der akute Toxizitätstest wurde in 100-ml-Bechergläsern (pro Konzentration dreifach) durchgeführt. (Abb. 3). In jedem Becherglas gab es 10 Individuen. Nur *Daphnien*, die jünger als 24 Stunden waren, wurden für die Tests verwendet. Sie wurden im Labor bei natürlichem Licht gehalten. Die Ergebnisse für die 48h-EC<sub>50</sub>-Werte wurden unter Anwendung der Probit-Analyse mit der Software EKO-TOX 5.2 berechnet. Parameter der Wasserqualität (Temperatur, Sauerstoff und pH) wurden während der Toxizitätstests zum Zeitpunkt 0, nach 24 h und am Ende der Tests (48 h) bestimmt. Sauerstoff und Temperatur wurden mit dem WTW Multimeter (Multi 3410, Weilheim, Germany) und der pH-Wert mit dem WTW pH-meter (3110, Weilheim, Germany) gemessen.

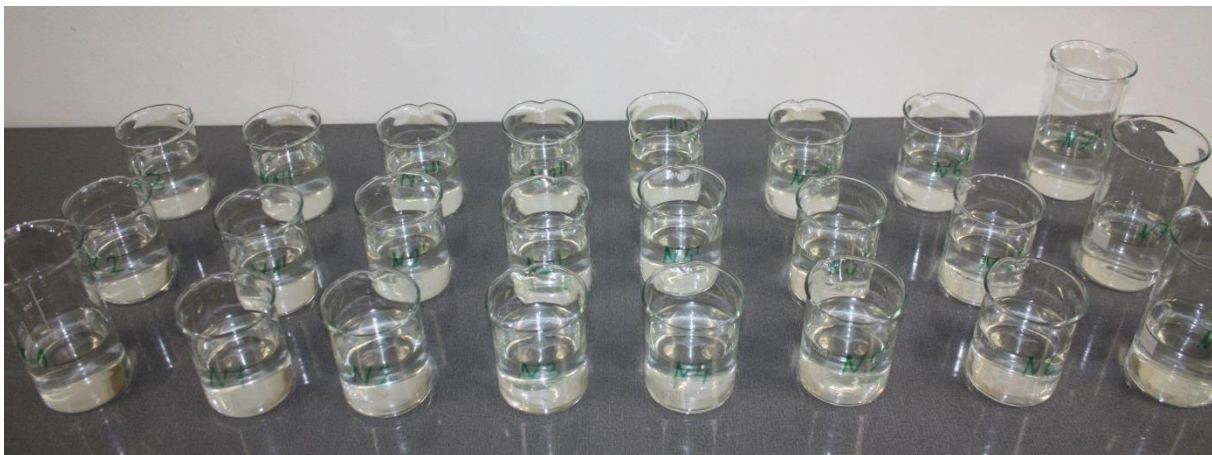


Abb. 3. Überprüfung des Einflusses der Enzyme auf *Daphnien* im Teichwasser.

**Untersuchung der Auswirkungen von Proteasen auf Sedimentorganismen**

Die Wirkung von zwei verschiedenen Proteasen (Alcalase® und Neutrase®) auf die den Teichboden bewohnenden Larven von *Chironomus riparius*, einer im Süßwasser lebenden Diptere, wurde mittels Toxizitätstests bestimmt. Das 10-tägige Experiment wurde mit der 1. Generation der Larven in Teichsediment und in Teichwasser durchgeführt. Das Teichsediment wurde unter Verwendung eines Bodengreifens nach Ekman (225 cm<sup>2</sup>) von zufällig ausgewählten Stellen im Teich gesammelt. Sedimentproben wurden homogenisiert und in Kunststoffbeuteln bei -20 °C aufbewahrt. Vor den Tests

wurde der Teichboden vollständig aufgetaut. Im Anschluss wurde das Sediment erneut homogenisiert und in 600-ml-Bechergläser gegeben (Abb. 4). Das Sediment wurde mit gefiltertem (132 µm) Teichwasser im Verhältnis 4:1 (Teichwasser: Teichboden) überschichtet. Frisch gelegte Eier von *Chironomus riparius* wurden vom Forschungszentrum für toxische Verbindungen in der Umwelt, Brünn, Tschechische Republik, bezogen. Teichboden (5 Tage), Teichwasser (24 h), sowie Eier (5 Tage) waren vor den Experimenten an die Raumtemperatur des Labors adaptiert worden. In jedes Versuchsgefäß wurden zwanzig Larven des ersten Larvenstadiums gegeben und zufällig verteilt. Alle Testgefäße wurden belüftet. Die Larven wurden täglich mit 0,5 mg Tetramin®/Larve gefüttert. Sechs Konzentrationen (0, 1, 10, 100, 500 und 1000 mg/l) wurden je Protease (Alcalase® und Neutrase®) gewählt. Es erfolgte für jede Konzentration eine 5-fache Wiederholung. Die Versuche wurden bei natürlichem Licht durchgeführt. Parameter der Wasserqualität (Temperatur, Sauerstoff und pH) wurden zu Beginn und am Ende des Versuchszeitraumes gemessen. Sauerstoff und Temperatur wurden mit dem WTW Multimeter (Multi 3410, Weilheim, Germany) und der pH-Wert mit dem WTW pH-meter (3110, Weilheim, Germany) gemessen. Nach einer 10-tägigen Exposition wurde die Zahl der abgestorbenen Larven gezählt und EC<sub>25</sub> mittels Probit-Analyse mit der Software GraphPad Prism - Version 5.00 (2007) berechnet.



**Abb. 4.** Untersuchung der Auswirkungen von Proteasenanwendung auf *Chironomus riparius* in 600-ml-Bechergläser.

#### ***Befragung von Teichwirten im Hinblick auf deren Einstellung zur Anwendung von Proteasen zur Desinfektion***

Von Januar bis März 2017 wurde eine Befragung von 57 Karpfenteichwirten aus Nordbayern sowie im Jahr 2018 von neun bayerischen Forellenzuchtbetrieben bezüglich der Desinfektion ihrer Haltungseinheiten sowie deren Anforderungen an neue Desinfektionsmittel durchgeführt. Die Fragen wurden mit dem Ziel formuliert, Kenntnisse über die tatsächliche Desinfektion zu erlangen und Daten über die praktische Anwendung zu erhalten.



## 4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

### **Untersuchung von Wasserparametern**

Die Bandbreiten der pH-Werte des Teichwassers reichten von 6,67 bis 10,5, die des Ammoniums von 0,00 bis 5,00 mg/l und des Sauerstoffgehaltes von 0,01 bis 20,00 mg/l. Die Mittelwerte der wichtigsten Wasserparameter liegen größtenteils innerhalb der für Fische gut verträglichen Grenzen. Ausnahmen waren die Beobachtungen von sehr niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (0,01 mg/l bzw. 0,02 mg/l). Unter diesen Umständen sind Fische nicht lebensfähig. In Teichen, besonders in Bodennähe, können derartig niedrige Werte bei mangelndem Lichteinfall auch an sonnenreichen Tagen immer wieder vorkommen.

### **Untersuchungen zu/der Bodenproben, Bodenparameter und Ausbringung der Proteasen in Teichparzellen und Stabilitätsuntersuchungen**

Die untersuchten Parameter der Qualität der Teichböden zeigten eine relativ hohe Bandbreite. Die höchste Variation wurde beim Gesamt-Phosphat, bei der mikrobiellen Aktivität und der mikrobielle Biomasse beobachtet. Die Werte reichten hier bei Gesamt-Phosphat von 20 mg/100 g Boden (Trockenmasse) bis maximal 341 mg/100 g Boden (Trockenmasse). Die Bandbreite reichte bei der mikrobiellen Aktivität von 6,2 (VOL O<sub>2</sub> ml/3min) bis 208,80 (VOL O<sub>2</sub> ml/3min) und bei der mikrobiellen Biomasse von 168,38 (µgC/gTS) bis 1993,23 (µgC/gTS). Die für die Desinfektion maßgeblichen Parameter sind der pH-Wert sowie möglicherweise der Gehalt an organischer Substanz. Der pH-Wert des Teichbodens in gefüllten Teichen betrug im Mittel 6,95 (2016) und hatte eine Bandbreite von 4,63 – 7,62. Die Gehalte an organischer Substanz bewegten sich von 0,96 % - 13,7 % und betrug im Mittel 6,4 %.

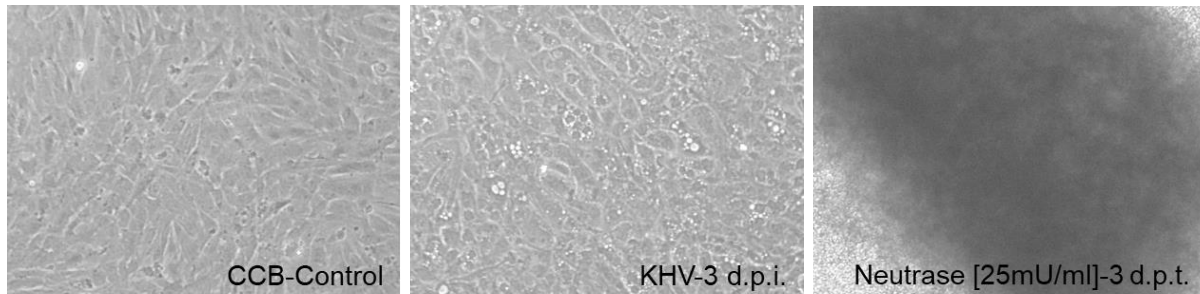
### **Ermittlung der Zelltoxizität verschiedener Proteasen in permanent wachsenden Fischzellkulturen**

Zur Vermehrung der Zielviren sowie Bestimmung deren Titer wurden in diesem Forschungsvorhaben die Zelllinien CCB, RTG-2 und EPC verwendet. Um den Einfluss der Proteasen auf diese Zellen zu untersuchen, wurden Dosis-Wirkung-Kurven bei mehreren Temperaturen (die z.B. für die Stammhaltung der Zellen und/oder die Virusreplikation verwendet werden) mit zwei ausgesuchten, kommerziell verfügbaren Enzymen – Neutrase® und Alcalase® – sowie einem weiteren, aus natürlicher Quelle (*Carica papaya*) gewonnenem Enzym – Papain – aufgenommen und die mittleren effektiven Konzentrationen (EC<sub>50</sub>) für die jeweilige Kombination von Enzym und Zelllinie bei der entsprechenden Temperatur ermittelt.

Dabei lagen die ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte für die jeweiligen Enzymlösungen im gleichen Bereich, was auf die ähnlichen toxischen Effekte bei allen drei untersuchten Zelllinien hindeutet. Während die Größenordnung der EC<sub>50</sub>-Werte für Neutrase® und CCB-, RTG-2- oder EPC-Zellen im Bereich von mg<sub>Enzymlösung/ml</sub> lag, bewegten sich die Werte für Alcalase® bei Verwendung der gleichen Zellen um eine Größenordnung niedriger (µg<sub>Enzymlösung/ml</sub>). Bei der dritten, nativen Protease – Papain – waren EC<sub>50</sub>-Werte auf dem ähnlichen Niveau wie im Falle von Neutrase® (mg<sub>Enzymlösung/ml</sub>). Somit ist die toxische Auswirkung auf die untersuchten Zellen im Fall von Alcalase® am stärksten, gefolgt von Neutrase® und Papain.

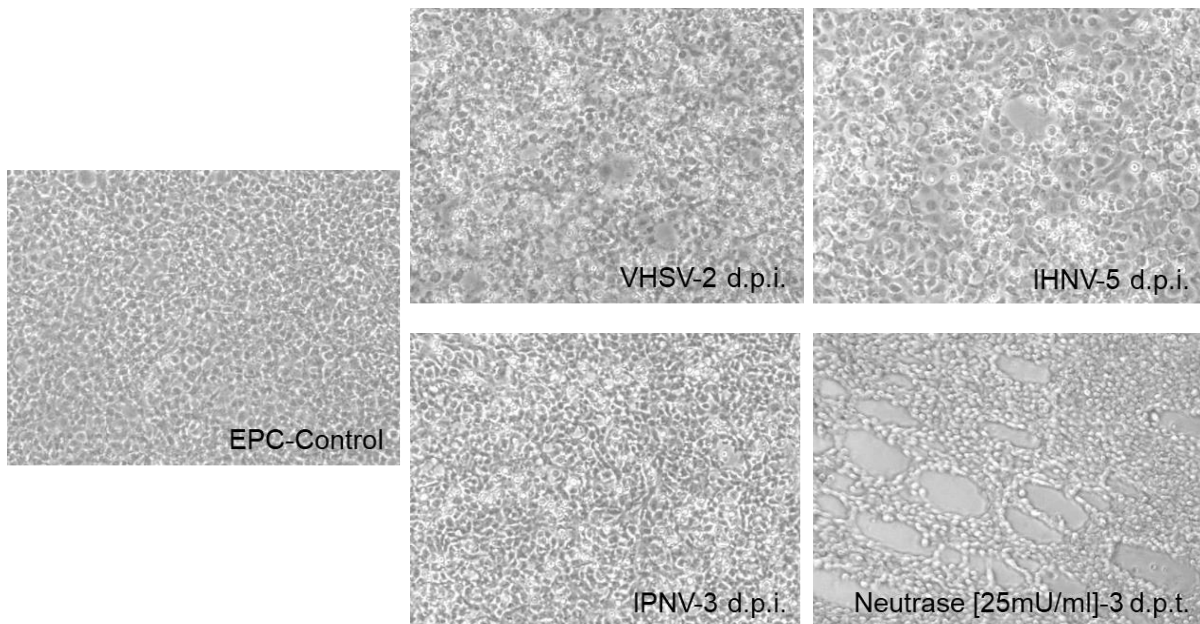
Aufgrund der hohen Standardabweichung der EC<sub>50</sub>-Werte, die auf die biologische Komponente des Assays zurückzuführen ist, konnten keine definitiven Aussagen über den Temperatureinfluss auf die toxischen Effekte des jeweiligen Enzyms getroffen werden.

Zusätzlich wurde die toxische Aktivität der Neutrase® direkt in Zellkulturen mit, aber auch ohne Infektion beobachtet (Abb. 5). Die Zellen lösten sich sofort nach Zugabe der Neutrase® komplett ab. Sowohl CCB- als auch EPC-Zellen reagierten damit auf die Anwesenheit von Neutrase® mit kompletter Zerstörung des Zellrasens. Dies ist in den Kulturen mit Virus, aber ohne Neutrase, nicht beobachtet worden.



**Abb. 5.** Reaktion der CCB-Zellen mit und ohne KHV-Infektion 3 dpi bei 26°C, 10x Vergrößerung

Es zeigte sich allerdings auch, dass EPC-Zellen resistenter gegenüber der Neutrase® waren als die CCB-Zellen (Abb. 6).



**Abb. 6.** Reaktion der EPC-Zellen nach Infektion mit VHSV, IHN-5 und IPNV ohne Neutrase®-Behandlung versus Neutrase® ohne Virus 10x Vergrößerung

### ***Proteolytische Aktivität der ausgesuchten Enzymformulierungen***

Die proteolytische Aktivität der zur Inaktivierung von Viren eingesetzten Enzyme kann durch Parameter, wie Temperatur, pH-Wert sowie die Zusammensetzung der Matrix in der die Behandlung stattfindet, beeinflusst werden. Um die verschiedenen Einflüsse besser einzuschätzen sowie das Desinfektionspotenzial der Proteasen bewerten zu können wurden verschiedene Experimente mit Neutrase® und Alcalase® durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse sind in folgenden Absätzen zusammengefasst.

### a) Vergleich der gemessenen proteolytischen Aktivität mit den nominalen Aktivitäten

Da die vom Hersteller angegebenen proteolytischen Aktivitäten, der in dieser Studie benutzten Proteaseformulierungen, mit unterschiedlichen Verfahren und unter verschiedenen Bedingungen gemessen wurden, ist der direkte Vergleich der Enzyme erschwert. Um die Mengen, die zu der Inaktivierung der einzelnen Viren notwendig sind, mit einem bestimmten Enzymprodukt vergleichen zu können, sind in diesem Bericht die Mengen als mg bzw. µg der Formulierung per ml Lösung angegeben. Des Weiteren wurde die proteolytische Aktivität der Neutrase® und Alcalase® mit Hilfe von *Protease assay kit Fluorometric-Red, Abcam* in Reinstwasser bei 25 °C (wie bei den Inaktivierungsversuchen) in Relation zur Aktivität von Trypsin bei 37°C bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2. dargestellt.

Enzymlösung	Gemessene Aktivität (25 °C) <sup>1)</sup>	Nominale volumetrische Aktivität*
	[*10 <sup>3</sup> U/ml]	[U/ml]
Neutrase®	40	5
Alcalase®	4.000	0,24

<sup>1)</sup> Bestimmung im Reinstwasser, Kalibrierung mit Trypsin bei 37°C; \*Herstellerangaben

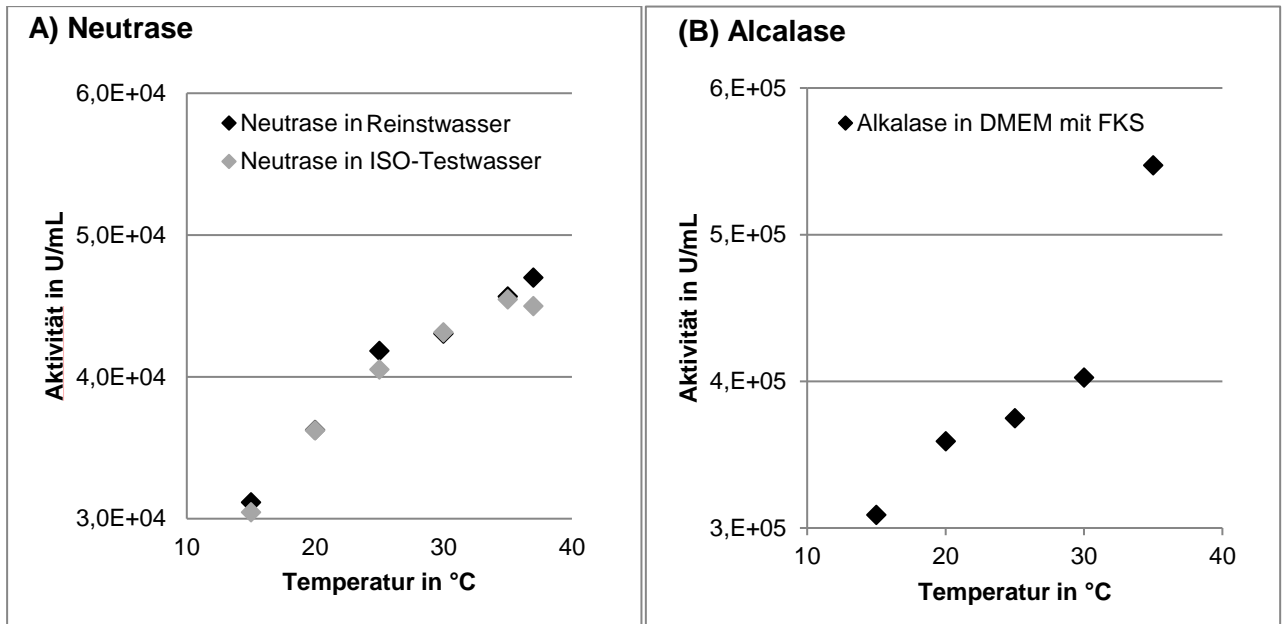
**Tabelle 2. Gemessene proteolytische Aktivität von Neutrase® und Alcalase® im Vergleich zu den vom Hersteller angegebenen nominalen volumetrischen Aktivitäten.**

Bestimmt in Reinstwasser bei 25 °C anhand der Kalibrierung mit Trypsin (37°C) mit Hilfe des *Protease assay kit Fluorometric-Red, Abcam*.

Die hier gemessene proteolytische Aktivität der Alcalase® war nicht nur deutlich höher als die vom Hersteller angegebene volumetrische Aktivität, sondern auch 100-fach höher im Vergleich zu der mit dem gleichen Protokoll gemessenen Aktivität der Neutrase®, was sehr gut mit den Ergebnissen der Virusinaktivierungs- sowie Zelltoxizitätsversuche übereinstimmt.

### b) Temperaturabhängigkeit der Proteaseaktivitäten

Da die Temperatur einen großen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme haben kann, wurde in Folge die proteolytische Aktivität von Neutrase® und Alcalase® bei verschiedenen Temperaturen mit Hilfe des gleichen Assays (*Protease assay kit Fluorometric-Red, Abcam*) untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 7:** (A) Neutrase®, (B) Alcalase® dargestellt.



**Abb. 7. Proteolytische Aktivität der Neutrase® und Alcalase® bei verschiedenen Temperaturen.**

Bestimmt im Reinst- und ISO-Wasser bzw. Zellkulturmedium mit Hilfe des *Protease assay kit Fluorometric-Red*, Abcam. Die Aktivität berechnet in Bezug auf die proteolytische Aktivität des Trypsins bei 37°C.

Wie in der Abbildung 7 ersichtlich, verlaufen die Punkte gerade im Bereich von niedrigeren Temperaturen (15 bis 25 °C), trotz verschiedener proteolytischer Aktivität der Ausgangslösungen von Neutrase® und Alcalase® sowie einer etwas unterschiedlichen Temperaturabhängigkeit, sehr ähnlich. Die Aktivität der beiden Enzyme war bei 25 °C ca. 20 % höher als bei 15 °C, was natürlich eine Auswirkung auf den Erfolg der Desinfektion bei niedrigeren Inkubationstemperaturen haben kann und bei der Abschätzung der benötigten Enzymmenge in Betracht gezogen werden muss.

Bestätigt konnte dies mit den Untersuchungen zur Toxizität der Neutrase® mit Zellkulturen, aber auch am Fisch werden. Wie in Abb. 5 beschrieben, reagierten die CCB- und EPC-Zellen nur geringgradig verschieden. Dies konnte auch im MTT-Kit zur Bewertung der Enzymaktivität nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass dies auch mit den unterschiedlichen Inkubationstemperaturen in Zusammenhang steht (Tab. 3). Bei geringeren Temperaturen scheint die Resistenz gegenüber der Protease besser zu sein.

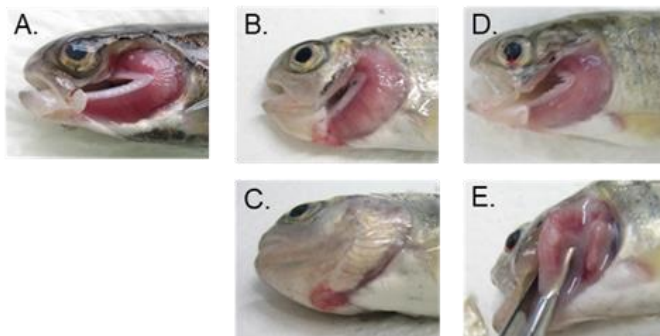
Zelle	Temperatur	EC <sub>50</sub> [mU/ml]
CCB	26°C	0.50-0.74
EPC	15°C	1.39-23.7

**Tabelle 3:** Gemessener EC<sub>50</sub>-Wert nach Neutrase®-Behandlung für CCB und EPC-Zellen

Dies wurde im Tierversuch allerdings gegenteilig entsprechend nachgewiesen. So reagierten die Forellen, die bei 15°C gehalten wurden, wesentlich empfindlicher auf Neutrase® als die bei 20°C gehaltenen Karpfen. Nach der Neutrase®-Behandlung mit 25 mU/ml setzte die Mortalität bei Karpfen nach ca. 72 h ein und endete mit 100% Sterblichkeit nach 120 h. Bei den Forellen setzte die 100 %ige



Mortalität schon 2 h nach der Neutrase®-Behandlung mit nur 16 mU/ml ein (Abb. 8). Bei Einsatz von 5 mU/ml Neutrase® (50 mU/ml in der 1:10-Verdünnung) konnten jedoch keine Symptome oder Todesfälle bei beiden Fischarten beobachtet werden.



**Abb. 8.** Blutungen in den Kiemen und in den Augen von gestorbenen Forellen (16 mU/ml Neutrase®)

A. negative Kontrolle ohne Neutrase®-Behandlung

B. und C. nach 2 h Neutrase®-Behandlung

D. und E. nach 24 h Neutrase®-Behandlung

### **c) Aktivität der ausgesuchten Proteasen bei verschiedenen pH-Werten**

Um die Versuche zur Virusinaktivierung mit Hilfe von Proteasen bei verschiedenen pH-Werten, die in Teichwässern auftreten können, so effizient wie möglich planen zu können, wurden zuerst die proteolytische Aktivitäten von Neutrase® und Alcalase® in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Dazu konnte das *Protease assay kit Fluorometric-Red, Abcam* nicht herangezogen werden, da das Assay mit verschiedenen pH-Werten nicht kompatibel ist. Aus diesem Grund wurde ein Protokoll, basierend auf Serumalbumin (BSA) und Gelelektrophorese (SDS-PAGE), etabliert, um qualitative Aussagen über den Proteinverdau bei verschiedenen Inkubationsparametern zu ermöglichen.

Bei den Versuchen wurde eine Lösung von BSA im Phosphatpuffer mit dem entsprechenden pH-Wert vorbereitet und mit der Neutrase® (53 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml Endkonzentration) bzw. Alcalase® (0,08 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml) versetzt. Nach dem Durchmischen wurden die Proben aufgeteilt und die Hälfte sofort (nach 2 min) denaturiert und die andere Hälfte für 24 h bei 8 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden auch die restlichen Proben denaturiert und die Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. Dabei galten die Proben die bereits nach dem Durchmischen denaturiert wurden als Referenz. Anhand des Versuchs konnte festgestellt werden, dass die Enzyme in dem pH-Bereich zwischen 4,5 und 8 ihre proteolytische Aktivität behalten und die Proteine verdauen können. Ebenfalls zeigten die Gele, dass der enzymatische Verdau (nach 24 h) von BSA mit Neutrase® bei den pH-Werten zwischen 4,5 und 5,0 etwas effektiver als bei höheren pH-Werten war. Des Weiteren, dass bei der Behandlung von BSA mit Alcalase® bei pH 7,4 und 8 bereits nach 2 min keine Verdauungsprodukte > 20 kDa mehr nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu konnten bei Alcalase® und pH 5 und pH 6 noch Rückstände des unverdauten BSA (66 kDa) beobachtet werden, auch wenn das Protein zum Teil schon nach 2 min fragmentiert wurde.

### **d) Stabilität/Inaktivierung der ausgesuchten Enzymformulierungen in verschiedenen Wasserproben**

Um abschätzen zu können wie lange die proteolytische Aktivität von Neutrase® und Alcalase® in realen Wässern erhalten bleibt, wurden diese Enzyme zu sterilfiltrierten und nicht sterilfiltrierten Wasserproben hinzugefügt und bei Raumtemperatur (Laborbedingungen, natürliche Beleuchtung) bis zu 2 Wochen inkubiert. Als Referenz zu den Umweltwasserproben diente Leitungswasser (unsteril) und steriles Zellkulturmedium. Die Aktivität der Enzyme wurde in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des *Protease assay kit Fluorometric-Red, Abcam* gemessen.

Diese Stabilitätsversuche zeigten deutlich, dass diese Proteasen in Teichwasser (unfiltriert und filtriert) schon nach 2 Tagen einen Aktivitätsverlust von etwa 20 % erfahren und nach über einer Woche eine Enzymaktivität kaum/nicht mehr feststellbar war. Im Vergleich dazu blieben die Aktivitäten in sterilem Zellkulturmedium über 2 Wochen annähernd gleich und erfuhren in Leitungswasser erst nach einer Woche eine Abnahme um 20 %.

**e) Aktivität der Neutrase® zur Inaktivierung von Viren im Vergleich zu kommerziellen Desinfektionsmitteln**

Zum Vergleich der Enzymaktivität in unterschiedlichen Konzentrationen bei der Inaktivierung von Viren wurden HuwaSan® TR-50 (Roam Chemie NV) und Virkon Aquatic (DuPont) in den vom Hersteller empfohlenen Verdünnungen als Kontrollen verwendet. Die Untersuchung wurde in 1 L-Aquarien mit KHV und VHSV über 24 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Material	Konzentration	KHV (CCB)		VHSV (EPC)	
		T <sub>R</sub>	Nachweisgrenze (log <sub>10</sub> )	T <sub>R</sub>	Nachweisgrenze (log <sub>10</sub> )
Neutrase®	25 mU/ml	3.00	2.50	4.87	2.50
	5 mU/ml	3.00	2.50	5.74	1.63
	0.5 mU/ml	4.00	1.50	4.75	-
TR50	1%	2.00	3.50	4.87	2.50
VIRKON	0.1%	3.00	2.50	4.87	2.50

**Tab. 4.** Titerreduktion 24 h nach Neutrase®-Behandlung im Wasser im Vergleich zu kommerziellen Desinfektionsmitteln HuwaSan® und Virkon Aquatic®

Die Berechnung der Titerreduktion erfolgte nach folgender Formel:

$$TR = \log_{10} TS - \log_{10} TE$$

TR – Titerreduktion, TS – Titer vor der Proteasebehandlung, TE – Titer 24 h nach der Enzymbehandlung bzw. der Nachweisgrenze begründet durch die Toxizität des Enzyms

Obwohl 24 h nach der Behandlung mit Neutrase® (25 mU/ml, 5 mU/ml) bzw. mit den kommerziellen Desinfektionsmitteln kein Virus in Zellkulturen repliziert werden konnte, war es die Nachweisgrenze des Tests (toxische Reaktion auf die Zellen in niedrigen Verdünnungsstufen), welche es nicht immer erlaubte, eine Reduktion des Titers um log<sub>4</sub>-Stufen sichtbar zu machen. Dies gelang für das KHV nur, wenn die Enzymkonzentration mit 0,5 mU/ml sehr gering gewählt wurde. Es muss allerdings davon ausgegangen werden, dass auch in höheren Proteasekonzentrationen alle Viren inaktiviert werden. Für die EPC-Zellen war ermittelt worden, dass diese resistenter gegenüber exogenen Noxen sind als die CCB-Zellen. Unter Nutzung dieser Kenntnis und hoher Ausgangstiter beim VHSV gelang es, die 4-log-Reduktion im Virustiter bei Neutrase®-Konzentrationen > 5 mU/ml zu erreichen. Ab und unter 5 mU/ml werden auch die VHSV nur unzureichend inaktiviert. Auch das VHSV wurde erfolgreich mit den kommerziellen Desinfektionsmitteln innerhalb von 24 h inaktiviert.

Als zusätzliches Ergebnis dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Viren im Wasser weniger stabil als in Medium sind und dadurch geringere Konzentrationen der Neutrase® zur

Inaktivierung benötigt werden. Eine Neutrase®-Konzentration von mehr als 50 mU/ml war stets ausreichend, um eine 100%ige Inaktivierung zu erreichen.

### ***Inaktivierung von Zielviren und Titerreduktion bei der Behandlung mit Proteasen***

#### ***a) Verschiedene Konzentrationen von Enzymen bei 8 und 25 °C (24-h Inkubation)***

Zuerst wurden die Inaktivierung von KHV, VHSV und IHNV mit Neutrase®, Alcalase® und Papain bei einer 24-h-Inkubation bei 8 und 25 °C (pH 7,4) mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Enzyms getestet. Nach der Inkubation mit Enzymen wurden in den Proben sowohl Virustiter als auch Kopienzahl des genetischen Materials der untersuchten Viren bestimmt. Die Titerreduktion ( $T_R$ ) wurde anhand des Virustiters vor und nach der Protease-Behandlung berechnet (Gleichung 1), wobei eine erfolgreiche Desinfektion ab einem  $T_R$ -Wert von 4 angenommen wurde (Eine Reduktion der Infektiosität des Virus um 4-Potenzen bzw. 99,99 %).

Die Inkubation mit Neutrase® bei 25 °C und den gewählten Versuchsparametern führte bei allen drei Zielviren zu  $T_R$ -Werten  $\geq 4$ , also erfolgreicher Desinfektion. Für KHV und VHSV konnte dies auch bei 8 °C erreicht werden, lediglich die Inaktivierung von IHNV war bei dieser Temperatur und der Konzentration des Enzyms für die Desinfektion nicht ausreichend. Zur ausreichenden Inaktivierung bei 25 °C wurde für Neutrase® eine Konzentration von mindestens 0,53 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml für VHSV und 5,3 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml für KHV und IHNV benötigt.

Die Anwendung von Alcalase® resultierte in der Desinfektion von KHV und VHSV nur bei 25 °C bei den höchsten untersuchten Enzymkonzentrationen (mindestens 0,05 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml für KHV und 0,08 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml für VHSV). Bei den eingesetzten Konzentrationen der Alcalase® bei 8 °C konnte eine ausreichende Inaktivierung der Zielviren nicht erreicht werden, wobei die höchsten Titerreduktionen hier für KHV verzeichnet wurden ( $T_R > 3,6$  ab 0,05 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml).

Das native Enzym – Papain – führte bei diesem Versuchsssetup zur Desinfektion von VHSV und IHNV (bei Mindestkonzentration von 2,13 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml) und zur Inaktivierung von KHV ( $T_R = 3,9$ ), jedoch nur bei 25 °C. Der Titer von keinem der hier untersuchten Viren konnte mit dem Enzym bei 8 °C um mehr als 3-Potenzen reduziert werden.

Somit konnte die Desinfektion der Zielviren bei den hier ausgesuchten Versuchsparametern am häufigsten mit Hilfe der Neutrase® erreicht werden. Auch wenn die Inkubation mit Alcalase® zu einer erfolgreichen Desinfektion nur bei KHV und VHSV bei 25 °C geführt hat, waren die dafür benötigten Konzentrationen des Enzyms mindestens 10-fach niedriger im Vergleich zu Neutrase® oder Papain. Gleichzeitig zeigte die PCR-Auswertung der Versuche keine relevante Abnahme der viralen DNA/RNA in Folge der Enzymbehandlung.

#### ***b) Verschiedene Inkubationsdauer (bis 4 h bei 8 und 25 °C)***

Um die für die Desinfektion benötigte Dauer der Proteasebehandlung zu bestimmen, wurde der zeitliche Verlauf der Inaktivierung von KHV, VHSV und IHNV mit den vorher als effektiv bestimmten Konzentrationen von Neutrase® (53 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml) und Alcalase® (0,08 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml) nach einer 0,5-, 1-, 2- und 4-h-Inkubation mit dem jeweiligen Enzym bei 8 und 25 °C (pH 7,4) überprüft.

Dabei zeigte sich, dass Neutrase® bei KHV bei beiden Temperaturen bereits nach 30 min zur Desinfektion führte, während bei Alcalase® der gleiche Effekt nur bei 25 °C verzeichnet werden konnte.

Nichtdestotrotz konnte auch Alcalase® bei 8 °C zur Inaktivierung von KHV mit einem  $T_R$ -Wert von  $> 4$  führen, wobei eine Inkubationsdauer von 4 h benötigt wurde.

Trotz erfolgreicher Desinfektion bei 24-h Inkubation, konnte bei VHSV in diesem Versuch lediglich bei 25 °C eine Reduktion des Titers um 3 Potenzen nach 4 h Inkubation mit gleicher Konzentration der Neutrase® erreicht werden. Vergleichend führte Alcalase® zur Desinfektion des Virus bereits nach 2 bzw. 4 h bei respektive 25 und 8 °C.

Die Desinfektion ( $T_R > 4$ ) von IHNV konnte bei 25 °C sowohl mit Neutrase® als auch Alcalase® schon nach 0,5 h bzw. 4 h für das jeweilige Produkt verzeichnet werden. Leider konnte für das Virus der gleiche Effekt bei 8 °C mit keinem der untersuchten Enzyme erreicht werden, was mit den Daten vor 24-h Inkubation übereinstimmt.

### **c) Verschiedene pH-Werte des Medium (bei 8 °C und 24-h Inkubation)**

Wie oben beschrieben, können die pH-Werte der Gewässer in denen Fische gehalten werden je nach der Beschaffenheit der Umgebung und Sedimente sowie Jahreszeit variieren. Aus diesem Grund wurde die Inaktivierung der Zielviren mit 53 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml Neutrase® und 0,08 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml Alcalase® durch Inkubation in sterilen Pufferlösungen bei den pH-Werten zwischen 5 und 8 bei 8 °C über 24 h getestet. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der proteolytischen Aktivität der Enzyme wurden die Versuche unter niedrigerer (also für die Desinfektion weniger vorteilhafter) Temperatur durchgeführt. Da bereits in unseren früheren Untersuchungen gezeigt wurde (Amtmann *et al.* 2019), dass der pH-Wert alleine ebenfalls die Infektiosität der Viren beeinflussen kann, wurden hier als Referenz auch Proben mit dem Virusstock (bei gleicher Verdünnung und Matrix - Puffer, pH-Wert) mitgeführt, die gleichlang jedoch ohne Proteasezugabe inkubiert wurden.

Während nach 24 h ohne Proteasen bei den untersuchten pH-Werten von 5, 6, 7,4 und 8 der Titer von KHV um maximal ca. 1-Potenz sank (bei pH 5 und 8), resultierte die Inkubation mit beiden Enzymen – Neutrase® und Alcalase® - auch bei höheren und niedrigeren als standardmäßig in vorherigen Versuchen eingesetzten pH-Werten, in einer Inaktivierung des Virus bis unter die Nachweisgrenze des Titrationsassays und mindestens über 2-Potenzen ( $> 99\%$ ).

Ähnliche Ergebnisse wurden für VHSV verzeichnet: Auch wenn nach einer 24-h Inkubation bei pH-Werten von 5 und 6 der Virustiter teilweise über 1-Potenz abgesunken ist, bewirkte Neutrase® bei den entsprechenden pH-Werten eine noch stärkere Inaktivierung (bei pH = 5 und 6 → bis unter die Nachweisgrenze des Assays -  $T_R > 4$ , bei pH 7,4 und 8 →  $T_R \geq 2$ ). Die Inkubation von VHSV (24 h, 8 °C) mit Alcalase® führte bei pH 5,6 und 7,4 zu einer  $T_R \geq 3$  (nah an der Nachweisgrenze) und bei pH 8 zu einer Reduktion von über 2 Potenzen.

Keine relevante Inaktivierung konnte für IHNV ohne Neutrase® bei pH Werten zwischen 5 und 8 bei dem Versuchsaufbau festgestellt werden. Dafür reagierte IHNV auf die Behandlung mit der Protease ähnlich wie VHSV: bei pH-Werten von 5 und 6 wurde eine  $T_R \geq 3$ , bei pH 7,4  $T_R$  von 1,5 und bei pH 8,0 eine  $T_R$  von  $< 1$  berechnet.

Auch die Behandlung von IHNV mit Alcalase® bei verschiedenen pH-Werten zeigte Ähnlichkeit zu der Inaktivierung von VHSV mit der Protease. Während keine Titerreduktion von IHNV aufgrund von verschiedenen pH-Werten festgestellt werden konnte, resultierte die Inkubation mit Alcalase® bei allen untersuchten pH-Werten in  $T_R \geq 3$ .

#### ***d) Proteasebehandlung zur Inaktivierung von Zielviren in verschiedenen Wasserproben***

Um schließlich die Effektivität der Proteasenbehandlung in realen Wässern zu prüfen, wurden KHV, VHSV und IHNV zu den Wasserproben (unsteril) aus Forellen- und Karpfenteichanlagen aus der Region zugegeben (n = 6). Die Proben wurden aufgeteilt und jeweils die Hälfte (n = 3) mit Neutrased<sup>®</sup> (53 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml) bzw. Alcalased<sup>®</sup> (0,08 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml) versetzt. Nach einer 24-h Inkubation bei 8 °C folgte die Bestimmung von Titer und genetischem Material der Viren. Die Wasserproben ohne Enzyme aber mit Viruszugabe gelten als Stabilitätskontrolle. Zusätzlich wurde der Virusstock entsprechend auch im sterilen Zellkulturmedium verdünnt (n = 3), ebenfalls 24 h inkubiert und als Kontrolle für die Berechnung der Virustiterreduktion genutzt ( $T_{\text{start}}$ ).

Bei KHV im Medium und in beiden Umweltwasserproben wurde in diesem Versuch ohne Zugabe der Proteasen keine Abnahme des Virustiters nach 24 h verzeichnet. Im Gegensatz dazu resultierte die Inkubation mit Enzymen in  $T_R$  von > 4 bei Neutrased<sup>®</sup> und  $T_R > 3,5$  bei Alcalased<sup>®</sup> in beiden getesteten Wasserproben. Gleichzeitig konnten keine Unterschiede zwischen der Proteasebehandlung in Wasser aus Forellen- bzw. Karpfenteichanlagen festgestellt werden. Ebenfalls waren die Kopienzahlen des KHV in allen Proben innerhalb der Standardabweichung der Methode gleich.

Wie bei KHV konnte eine Proteasebehandlung unter diesen Versuchsbedingungen auch für VHSV festgestellt werden. Während ohne Enzym keine Änderung des Titers in allen Wasserproben gemessen wurde, resultierte die Behandlung mit Neutrased<sup>®</sup> in  $T_R$ -Werten von  $\geq 2,5$  (Wasser aus Forellenzucht mit Neutrased<sup>®</sup>  $T_R = 2,5$ , Wasser aus Karpfenzucht mit Neutrased<sup>®</sup>  $T_R = 3,0$ ) und mit Alcalased<sup>®</sup> in  $T_R$  von > 2,5 (Wasser aus Forellenzucht mit Alcalased<sup>®</sup>  $T_R = 2,8$ , Wasser aus Karpfenzucht mit Alcalased<sup>®</sup>  $T_R = 2,7$ ). Auch hier wurden keine Unterschiede bei der Behandlung in den verschiedenen Wasserproben beobachtet. Nur eine leichte Abnahme der Viralen RNA nach der Inkubation mit den Proteasen in Umweltwasserproben konnte verzeichnet werden.

Im Gegensatz zu KHV und VHSV bleibt das IHNV bei 8 °C durch die Behandlung mit Neutrased<sup>®</sup> unbeeinträchtigt: der Titer blieb in beiden Wasserproben auf dem gleichen Niveau. Lediglich bei Alcalased<sup>®</sup> konnte für IHNV  $T_R$  von 1,8 im Wasser aus Forellenzucht und von 2,1 im Wasser aus Karpfenzucht gemessen werden. Die qPCR Daten zeigten eine leichte Abnahme nach der Behandlung mit Alcalased<sup>®</sup> ( $\Delta C_q = 2,4$  bei Neutrased<sup>®</sup> und  $\Delta C_q = 1,7$ ).

#### ***Proteasebehandlung der Zielviren, deren quantitativem Nachweis und deren Weiterpassage zur Bestimmung der Titerreduktion in Zellkulturen***

Nachdem die Untersuchungen zur Reaktion der Neutrased<sup>®</sup> direkt auf die Zellen abgeschlossen waren, wurde die Aktivität unterschiedlicher Proteasekonzentrationen auf die Viren bei deren physiologischen Temperaturen geprüft: KHV bei 26°C und alle anderen Erreger (VHSV, IHNV und IPNV) bei 15°C. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit der Protease wurde die Infektiosität des Virus als auch die DNA (KHV) oder RNA (alle anderen Viren) quantitativ in der (RT)qPCR bestimmt. Signifikante Unterschiede in der Virozidie wurden für das KHV, das VHSV und das IHNV bestätigt. Nach Behandlung erfolgte eine Titerreduktion um mindestens 4 log-Stufen, wenn höhere Enzymkonzentrationen als 50 mU/ml eingesetzt wurden. Im Gegensatz zur Titerreduktion hatte die Proteasebehandlung keinen Einfluss auf die virale DNA bzw. RNA. Diese blieb gleich, was für die Anwesenheit inaktivierter Viruspartikel sprach. Für das IPNV jedoch hatten all diese Behandlungen keinen Einfluss auf die Infektiosität. Es konnte keine Titerreduktion nachgewiesen werden.

Dies konnte auch bei den Untersuchungen in der Proteomanalyse, zumindest für die viralen Proteine, dargestellt werden. Alle Viren wurden über Ultrazentrifugation gereinigt und konzentriert. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit den Proteasen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Im Vergleich zu den unbehandelten Viren konnten beim KHV, beim VHSV und beim IHNV Degradationen von bestimmten Proteinen der Hülle erkannt werden. Beim KHV waren die Proteine, welche durch die ORF 32, 81 und des Kapsidproteins des ORF 92 als auch die Glykoproteine der ORFs 25, 65 und 149 kodiert werden, degradiert. Gleiches galt für die Hüllglykoproteine der Norvirhabdoviren IHNV und VHSV. Im Gegensatz dazu waren die Kapsidproteine des IPNV VP2 und VP3 von den Enzymen unbeeinflusst geblieben.

Bestätigt wurde diese Beobachtung durch die Elektronenmikroskopie. Die oberflächlichen Hüllglykoproteine des KHV, des VHSV und des IHNV waren als Projektionen nach Behandlung im Gegensatz zur den nicht behandelten Viren nicht zu erkennen. Zusätzlich wurde die Immunogoldmethode am KHV durchgeführt. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers anti-KHV ORF 149-Proteins 10A9 konnten diese Glykoproteine bei den unbehandelten Viren gut markiert werden. Dies gelang bei den mit Proteasen behandelten KHV nicht.

### ***Stabilität der Zielviren in verschiedenen sterilen und unsterilen Wasserproben***

Um das Überdauern der drei Viren - KHV, VHSV und IHNV – in Umweltwasser zu untersuchen, wurde deren Stabilität, einerseits als Infektiosität (Titer), andererseits durch Bestimmung des genetischen Materials, über eine 168 h (7 Tage) - Inkubation (20 °C unter Lichtausschluss) vermessen. Parallel wurde die Stabilität der Zielviren ebenfalls in sterilisierten (Filtration 0,2 µm Porenfilter) Umweltwasserproben aus Forellen- und Karpfenteichanlagen bestimmt.

Als sterile Referenzproben wurden die Viren zum Zellkulturmedium und zu ISO-Testwasser (auch im Versuch mit *D. magna* eingesetzt) zugegeben und für die gleiche Zeit unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Zusätzlich wurden unsterile Proben mit Leitungswasser vorbereitet. Neben dem pH-Wert wurde für das verwendete Wasser auch die Leitfähigkeit und Härte bestimmt. Darüber hinaus wurde in den unsterilen Proben die Keimzahl bestimmt.

Während die Infektiosität der KH Viren in sterilem Zellkulturmedium über die Inkubationszeit von 96 h um etwa eine halbe Potenz abnahm ( $T_R = 0,6$ ;  $\Delta t = 96$  h), fiel der KHV-Titer im ISO-Testwasser um annähernd eine Potenz ( $T_R = 0,8$ ;  $\Delta t = 96$  h). Im Leitungswasser fiel der Virustiter nach 32 h stark ab und erreichte nach 72 h die Nachweisgrenze (12 TCID<sub>50</sub>/ml). Zu Beginn der Inkubation lag die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml im Leitungswasser bei etwa 10<sup>2</sup> KBE/ml, nach 24 h wurde ein Anstieg bis 2,4·10<sup>4</sup> KBE/ml beobachtet, wobei im Anschluss keine weitere Zunahme festgestellt werden konnte. Die Ergebnisse der qPCR zeigten für diese drei Proben einen ähnlichen Verlauf wie der Virustiter. Eine konstante Virus-DNA Kopienzahl/ml wurde in dem Versuch in Medium und ISO Testwasser gemessen, während die Kopienzahl im Leitungswasser nach 32 h um eine Zehnerpotenz abfiel und dann wieder annähernd konstant blieb. Der Starttiter der Proben mit Forellenwasser (steril und nicht steril) wies einen ähnlichen Wert auf, der allerdings nicht mit dem eingestellten Starttiter von 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> übereinstimmte, sondern um etwa zwei Zehnerpotenzen darunter lag. Im sterilfiltrierten Forellenwasser fiel der KHV Titer innerhalb von 96 h um etwas eine Potenz, wobei allerdings auch die Nachweisgrenze erreicht wurde. In nicht filtriertem Forellenwasser sank der Virustiter innerhalb von 8 h unter die Bestimmungsgrenze (120 TCID<sub>50</sub>/ml) und erreichte die Nachweisgrenze nach 24 h. Die Keimbelastung im unsterilen Wasser aus einer Forellenzucht stieg kontinuierlich innerhalb der Inkubationszeit bis auf einen Wert von 2,6·10<sup>4</sup> KBE/ml. Während die Virus-

DNA in den sterilfiltrierten Proben aus einer Forellenzucht über 96 h annähernd konstant blieb, fiel sie in nicht filtriertem Forellenwasser zwischen 8 und 96 h um zwei Zehnerpotenzen ab. In sterilfiltriertem Wasser aus einer Karpfenzucht nahm der KHV-Titer annähernd linear ab und lag nach 72 h bei der Nachweisgrenze. Im nicht filtrierten Karpfenwasser sank der Titer bereits nach 32 h bis an die Nachweisgrenze. Auch in diesen beiden Wasserproben war der bestimmte Virustiter zum Start der Inkubation um eine Zehnerpotenz geringer als der festgelegte Starttiter. Nicht steriles Karpfenwasser wies über dem Inkubationszeitraum von 96 h beinahe einen konstanten Wert von  $6 \cdot 10^3$  KBE/ml auf. Ähnlich zu den Proben aus einer Forellenzucht blieb der Gehalt von DNA von KHV in sterilen Karpfenwasserproben nahezu konstant, während in nicht sterilem Wasser eine Abnahme um 3,6 Zehnerpotenzen nach 96 h gemessen wurde.

Der gleiche Versuch wurde mit VHSV über 168 h durchgeführt. Wieder zeigte sich, dass der VHSV-Titer im Medium über die Zeit annähernd konstant blieb. Dafür fiel sowohl in ISO Testwasser als auch in Leitungswasser der Virustiter über die Zeit linear ab, wobei in Leitungswasser ein stärkerer Abfall ( $T_{R \text{ Leitungswasser}} = 3,3$ ,  $T_{R \text{ ISO Testwasser}} > 2,2$ ) stattfand. Gleichzeitig konnte keine relevante Reduktion der RNA von VHSV über die Inkubationszeit festgestellt werden. Die Keimzahl im Leitungswasser stieg innerhalb von 96 h kontinuierlich um vier Zehnerpotenzen an und lies sich zu späteren Zeitpunkten aufgrund von Überwucherungen der Petrischalen nicht mehr auswerten. Während in der sterilen Forellenwasserprobe sowohl Virustiter als auch RNA-Gehalt über die Zeit nahezu konstant blieben, fiel der Virustiter im unsterilen Wasser aus einer Forellenanlage nach 24 h unter die Nachweisgrenze ( $T_R > 4,5$ ) und die virale RNA um etwa zwei Zehnerpotenzen. Die Keimzahl in der nicht sterilen Probe aus einer Forellenzucht stieg nach 24 h stark an und blieb dann über die Zeit nahezu konstant bei einem Wert von  $9 \cdot 10^5$  KBE/ml. Ähnliche Ergebnisse wurden für VHSV im Wasser aus einer Karpfenteichanlage erreicht. In sterilfiltriertem Karpfenwasser blieben der Titer und der RNA-Gehalt von VHSV über die Zeit nahezu konstant, während in der nicht filtrierten Probe der Virustiter innerhalb von 24 h über 4,6 Zehnerpotenzen abnahm und die Nachweisgrenze erreichte. Auch hier nahm die virale RNA innerhalb der Inkubationszeit um mehr als 2 Zehnerpotenzen ab. Die Keimzahl blieb nach 24 h mit einem Wert von  $6 \cdot 10^5$  KBE/ml über die restliche Inkubationszeit annähernd konstant.

Letztlich wurde auch die Stabilität von IHNV in den gleichen Wasserproben unter gleichen Bedingungen über 96 h untersucht. Der Titer von IHNV nahm in Medium, ISO Testwasser und Leitungswasser über die Inkubationszeit um annähernd eine Zehnerpotenz ab ( $T_R = 0,7 - 1,4$ ;  $\Delta t = 96$  h), während die Menge an viraler RNA in diesen Proben annähernd konstant blieb. Die Keimzahl im Leitungswasser stieg in den ersten 72 h nahezu linear um annähernd fünf Zehnerpotenzen an und blieb dann für weitere 24 h konstant bei einem Wert von  $5 \cdot 10^5$  KBE/ml. In den sterilen Proben aus einer Forellenanlage fiel der IHNV Titer über die Inkubationszeit (96 h) um eine Zehnerpotenz, wobei die RNA des Virus unbeeinträchtigt blieb. In der nicht sterilen Forellenwasserprobe konnte ein starker Abbau des Virustiters nach 32 h Inkubation festgestellt werden ( $T_R = 4,0$ ;  $\Delta t = 32$  h), die Nachweisgrenze wurde nach 48 h erreicht. Auch der RNA-Gehalt von IHNV nahm nach 96 h um etwa zwei Zehnerpotenzen ab. Die Keimzahl in der nicht filtrierten Forellenwasser- Probe stieg innerhalb der ersten 24 h auf einen Wert von  $10^6$  KBE/ml und blieb dann bis zum Ende der Inkubation konstant.

### **Auswirkung der Proteasen auf die Mikroorganismen des Teichbodens**

Die Untersuchungen wurden im Hinblick auf die Auswirkung von Proteasen auf die Mikroorganismen im Teichboden in Versuchsgefäßen mit jeweils 5 l Volumen durchgeführt. Bei der Trockensubstanz und dem pH-Wert gab es nach 24 Stunden bzw. einem Monat beinahe keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die mittleren Werte der mikrobiellen Aktivität und der mikrobiellen Biomasse waren hingegen nach der Applikation von Neutrase® im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht. Es scheint so zu sein, dass vor allem die Neutrase®-Formulierung ein Nährmedium für die Mikroorganismen darstellen kann. Insgesamt zeigte sich durch die Ausbringung von Proteasen (Alcalase® und Neutrase®) kein hemmender sondern, insbesondere bei Betrachtung der Neutrase®, ein fördernder Effekt auf die mikrobielle Aktivität und die mikrobielle Biomasse im Teichboden.

### **Toxikologische Untersuchungen des Einflusses von Proteasen auf Zoo- und Phytoplankton**

Bezüglich der Verträglichkeit der Proteasen auf Algen konnten in den Labortests für Alcalase® bei *Desmodesmus subspicatus* ein Wert von 374 mg<sub>Enzymlösung/l</sub> (72h-LC<sub>50</sub>) und für die Neutrase® von 183 mg<sub>Enzymlösung/l</sub> (72h-IC<sub>50</sub>) ermittelt werden. Die 48h-EC<sub>50</sub>-Werte von Alcalase®- und Neutrase® für *D. magna* lagen respektive bei 128 mg<sub>Enzymlösung/l</sub> bzw. 471 mg<sub>Enzymlösung/l</sub>. In den Kontrollgruppen traten keine Mortalitäten auf und die Wasserparameter lagen während der Tests innerhalb des empfohlenen Bereiches.

### **Überprüfung des Einflusses der Enzyme auf Daphnien im Teichwasser**

Die Mortalität von *D. magna* im Teichwasser nahm mit steigender Konzentration von beiden Enzymen kontinuierlich zu. Bei den akuten Toxizitätstests für *Daphnien* wurden keine Mortalitäten in den Kontrollgruppen (0 mg/l) beobachtet. Die 48h-EC<sub>50</sub>-Werte der Alcalase®- und Neutrase® für *D. magna* im Teichwasser betragen 132 mg<sub>Enzymlösung/l</sub> bzw. 150 mg<sub>Enzymlösung/l</sub>. Die letalen Konzentrationen (48h-EC<sub>50</sub>-Werte) für diese beiden Enzyme waren, trotz unterschiedlicher Enzymaktivität, bezogen auf die verwendete Enzymmenge in mg sehr ähnlich.

Während der gesamten Untersuchung war die Wassertemperatur im Bereich von 21,0 - 22,4 °C. Sauerstoffgehalt und pH-Wert des Wassers nahmen kontinuierlich mit steigenden Konzentrationen für beide Enzyme ab. Am Ende der Toxizitätstests (48 h) mit *D. magna* waren die niedrigsten Sauerstoffgehalte bei den höchsten Konzentrationen beider Enzyme zu beobachten. Die Mittelwerte für den Sauerstoffgehalt betragen in der Testreihe für Alcalase® bzw. Neutrase® 3,4 ± 0,2 mg/l bzw. 4,2 ± 0,1 mg/l. Der Sauerstoffgehalt ist ein kritischer und in der Aquakultur gelegentlich limitierender Faktor für Fische. Karpfen reagieren weniger empfindlich auf Schwankungen des Sauerstoffgehalts als Salmoniden und können selbst bei Sauerstoffkonzentrationen von 3 - 4 mg/l effizient gezüchtet werden.

### **Auswirkung von Proteasen auf Organismen des Teichbodens**

Die Mortalität von Larven von *Ch. riparius* stieg mit zunehmender Konzentration beider Enzyme. Die Ergebnisse der *Chironomiden*-Toxizitätstests (10 Tage, EC<sub>25</sub>) von Alcalase® und Neutrase® für *Ch. riparius* betragen 507 mg<sub>Enzymlösung/l</sub> bzw. 607 mg<sub>Enzymlösung/l</sub>. In den Kontrollgruppen traten fast keine Mortalitäten auf. Alle Parameter lagen im empfohlenen Bereich für die Gültigkeit der Tests. Am Tag 0 waren die Mittelwerte der Parameter in allen Versuchsgruppen ungefähr gleich. Am Ende des Versuchs sanken jedoch mit zunehmender Enzymkonzentration von beiden Enzymen die mittleren Sauerstoffwerte. Dagegen stieg der pH-Wert am Ende des Versuchs mit steigenden Konzentrationen



beider Enzyme leicht an. Letzteres steht im Gegensatz zu den früheren Ergebnissen bei den Untersuchungen der Auswirkungen der Enzyme auf *Daphnien* im Hinblick auf den pH-Wert. In diesem Experiment sanken die Sauerstoffkonzentrationen und pH-Werte ebenfalls kontinuierlich mit zunehmenden Konzentrationen nach 24 h bzw. nach 48 h bei beiden Enzymen. Es ist anzunehmen, dass das Sediment (in der *Chironomiden*-Studie) und seine Pufferkapazität hierbei eine große Rolle spielen. Denn im *Daphnia*-Versuch wurde nur gefiltertes Teichwasser ohne Sediment verwendet.

#### ***In vivo*-Untersuchungen der Inaktivate am Zielfisch mit und ohne Teichsediment**

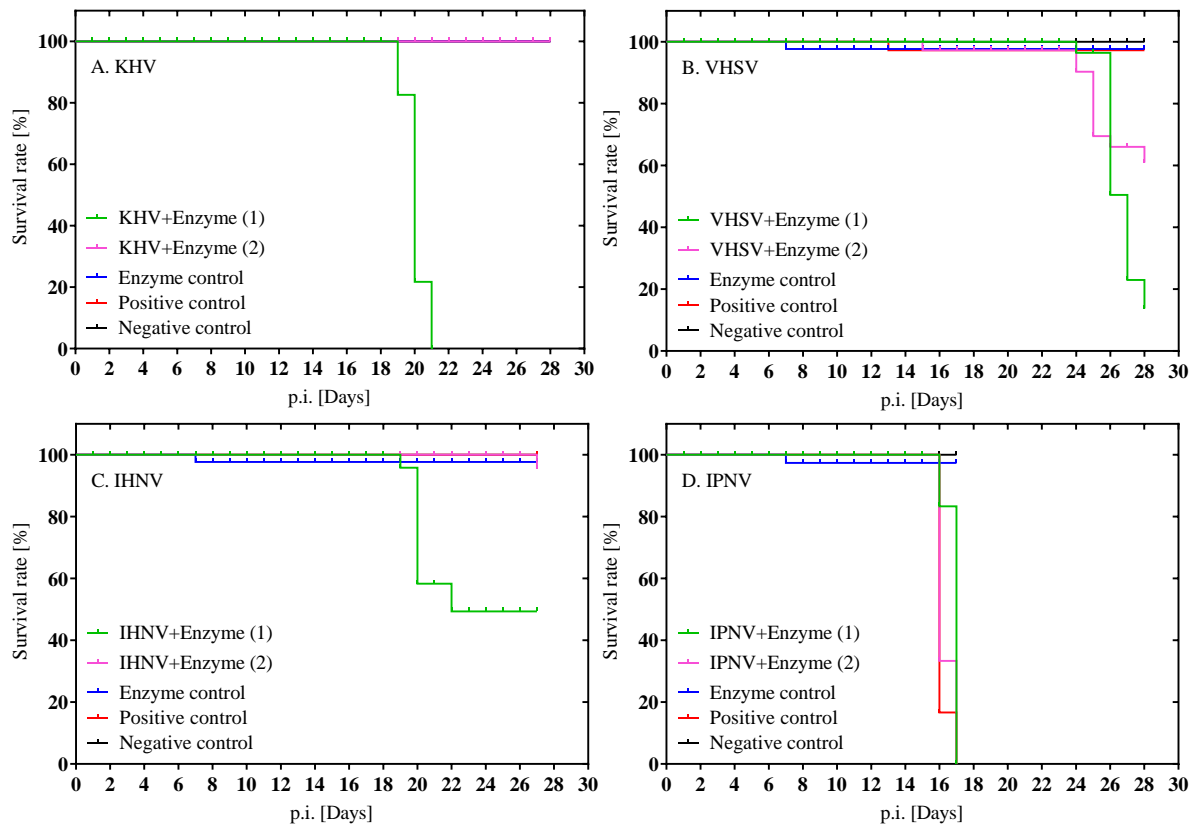
Die Untersuchungen wurden an Forellen und an Karpfen (beide n=25) durchgeführt. Die Virussuspensionen wurden mit 50 mU/ml Neutrase® für 24 h bei der für das Virus physiologischen Temperatur inkubiert: KHV bei 20°C und VHSV, IHNV und IPNV bei 15°C. Nach dieser Zeit wurden die Fische für 1 h in der 1:100 in Wasser verdünnten Mischung gebadet, dann in das Aquarium zurückgesetzt und für weitere 35 Tage beobachtet.

Aus dem Ansatz für die Inaktivierung wurden wiederum Proben für die Titration in Zellkulturen gezogen. Ausgehend von diesen Titrationen wurde die Inaktivierung mit einer Reduktion um log<sub>4</sub> sicher für das KHV und das VHSV nachgewiesen. Dies gelang auch für das IHNV, wenn auch in geringerem Maße. Das IPNV reagierte in keiner Weise mit der Protease und zeigte daher keine Reduktion im Titer (Tab. 5).

Virus	T <sub>S</sub> (log <sub>10</sub> )	T <sub>E</sub> (log <sub>10</sub> )	T <sub>R</sub> (log <sub>10</sub> )	Nachweisgrenze (log <sub>10</sub> )	Viruspartikeln im Tank	Virustiter / ml
KHV	6.50	n.d.	4.00	2.50	6.32x10 <sup>4</sup>	3.16 x10 <sup>2</sup>
VHSV	7.50	0.75	6.75	-	1.12x10 <sup>3</sup>	5.62 x10 <sup>1</sup>
IHNV	7.50	4.37	3.12	-	4.74x10 <sup>6</sup>	2.37 x10 <sup>4</sup>
IPNV	6.37	6.50	-0.12	-	6.32x10 <sup>8</sup>	3.16 x10 <sup>6</sup>

**Tab. 5.** Titerreduktion und verbliebene infektiöse Viruspartikeln im Wasser nach einer 24-stündigen Neutrase®-Behandlung ohne Sediment

In den Untersuchungen am Fisch zeigten die positiven Kontrolltiere mit KHV, VHSV und IHNV ohne Inaktivierung durch Neutrase® keine Zeichen einer Erkrankung. Im Gegensatz dazu war eine 50%ige Mortalität in den Gruppen mit Neutrase® und Virus zu beobachten (Abb. 9 A, B, C).



**Abb. 9.** Überlebensrate 30 Tage nach Bad (Doppelansatz beim Virus mit Neutrase®-Behandlung)

Im Gegensatz dazu zeigte das nicht umhüllte IPNV mit und ohne Proteasebehandlung eine 100%ige Mortalität mit klaren Symptomen der Pankreasnekrose bei den Forellen. Das IPNV wurde daher wiederum nicht von der Protease geschädigt (Abb. 9D).

In einem Becken des Doppelansatzes mit dem KHV trat eine 100%ige Mortalität auf. Diese Fische waren in Neutrase® behandelten KHV gebadet worden und zeigten sehr schwere Symptome der KHV-I vor allem auf der Haut (Abb. 10).



**Abb. 10** Dead fish after 21 days of KHV treated with Neutrase®

Aus allen gestorbenen Karpfen und bei 13 überlebenden Fischen aus dem Aquarium konnte das KHV mittels qPCR nachgewiesen werden. Dies wurde in der Histologie nach HE-Färbung und in der in-situ Hybridisierung bestätigt. In den histologischen Präparaten zeigte sich die Ursache, warum es in den Gruppen mit Neutrase® und Virus zu wesentlich höheren Mortalitätsraten kam als bei den positiven Kontrollen. Die Kiemen waren stark verkürzt, zum einen wesentlich schlanker und zum anderen wesentlich verdickter, zeigten blutgefüllte Herde im Gewebe, wiesen Vakuolen auf, eine verstärkte

Bildung von Schleimzellen war zu erkennen und ein massiver Anstieg der C-Zellen im Gewebe wurde sichtbar. Diese Veränderungen waren bei den negativen und den Enzymkontrollen als auch bei den positiven Kontrollen in dieser Massivität nicht zu beobachten. Der Effekt musste daher von der proteolytischen Reaktion der Neutrase® in Verbindung mit dem Virus stammen. In den Präparaten mit den Proben einiger enzymbehandelter Fische konnten in der Niere abgelöste Epithelzellen und Hämorrhagien und größere Blutungen um die Nierentubuli dargestellt werden. Es wird daher vermutet, dass für die wenigen nicht inaktivierten Viren ein Weg durch die Neutrase® in den Fischkörper geschaffen wurde, was zur heftigeren Infektion als bei den positiven Kontrollen führte. Durch den erleichterten Viruseintritt kam es zu schweren Symptomen und Todesfällen.

In allen Aquarien, in welchem Fische infiziert wurden, traten deutlich sichtbare Symptome der Infektion auf, aber idR ohne Mortalität.

Im letzten Experiment wurden die Konzentrationen der Viren (KHV, VHSV, IHNV und IPNV) auf  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml eingestellt und mit einer Neutrase®-Konzentration von 50 mU/ml behandelt. Aus der 1:10 Verdünnung der Reaktionsgemische im Hälterungswasser resultierte eine Enzymkonzentration von 5 mU/ml im Wasser, in welchem die Fische (n=10) für eine Stunde gebadet wurden. Beim KHV und den Karpfen und beim IHNV und IPNV konnten keine Mortalitäten beobachtet werden. Beim Einsatz des VHSV und der Neutrase® und in der VHSV positiven Kontrolle starben je eines der 10 Tiere. In allen positive Kontrollen waren die Fische erkrankt, zeigten aber unter Verwendung von IHNV und KHV keine Mortalität. In den Gruppen, die mit IPNV infiziert waren, konnten keine Veränderungen beobachtet werden. Von allen Tieren wurden am Ende des Versuchs Proben gewonnen, die derzeit virologisch ((RT)qPCRs, Zellkultivierungen), histologisch- molekularbiologisch (HE-Färbung und ISH) und serologisch (Antikörper-ELISAs) geprüft werden.

#### ***Untersuchungen zum Einfluss des Teichsediments auf die Neutrase®-Aktivität***

Aus den Ergebnissen mit den Fischen ging hervor, dass möglicherweise sogar ein Risiko entsteht, wenn die Protease eine proteolytische Reaktion erzeugt und sich ein Virus in der Umgebung befindet. Um den Einfluss der Teichumgebung auf die mögliche Inaktivierung der Neutrase® zu erkennen, wurde diese für 5 Tage mit und ohne Sediment, welches autoklaviert und native zum Einsatz kam, bei 26°C inkubiert. Dazu wurde die Reaktion von Leitungswasser mit verschiedenen aufgearbeiteten Proben vom Teichwasser (Partner LGL) geprüft. Die Aktivität der Neutrase® wurde mit dem Protease-activity kit (fluoremetric-red, Abcam) unter Verwendung von Trypsin als positive Aktivitätskontrolle nachgewiesen.

Sowohl vom pH-Wert als auch von den Temperaturen unterschieden sich die Ausgangslösungen ohne Sediment kaum (Tab. 6).

Lösung/Wasser	pH	Temperatur	Wasser	pH	Temperatur
Leitungswasser (Tap)	7.66	23.6°C	KTW**	8.42	23.3°C
Medium	7.95	23.3°C	GTW***	8.37	23.2°C
RAS*	7.47	23.1°C	FTW****	7.96	23.5°C

**Tab. 6.** pH-Wert und Ausgangstemperatur der Lösungen und Wasserpräparationen vor der Enzymreaktion

\* RAS = Kreislaufanlagen-Wasser

\*\* KTW = Teichwasser - nicht filtriert

\*\*\* GTW = filtriertes Teichwasser (132 µm-Filter)

\*\*\*\* FTW = Wasser aus einer Forellenteichwirtschaft

Es konnte gezeigt werden, dass die Neutrase® über 5 Tage bei 26°C ohne Sedimentzusätze in allen Medien stabil blieb (Abb. 11 A). Beim Zusatz von Teichsediment (autoklaviert und nicht autoklaviert) verlor die Protease in allen Medien innerhalb eines Tages signifikant an ihrer Aktivität (Abb. 11 B und C). Im autoklavierten Sediment war die Reduktion der Enzymaktivität geringer als mit dem nicht-autoklavierten Sediment (Abb. 11 B und C).

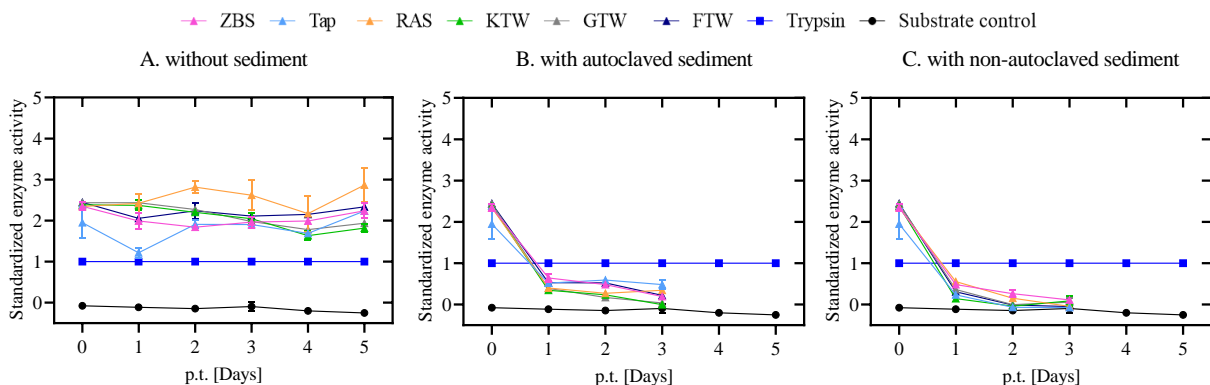


Abb. 11. Standardisierte Messung der Neutrase®-Aktivität in verschiedenen Medien mit und ohne Sediment

Als eine Ursache für die stärkere Inaktivierung der Protease mit nicht autoklaviertem Sediment kann der sich ausbildende saure pH-Wert, verursacht von den im Sediment vorhandenen Mikroorganismen, angenommen werden (Abb. 12).

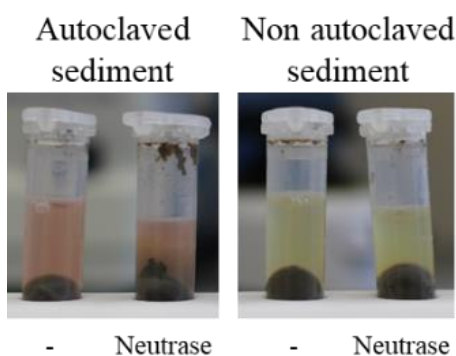


Abb. 12 Änderung des pH-Wertes im Zellkulturmedium nach einer 24-stündigen Inkubation bei 26°C mit autoklaviertem und nicht autoklaviertem Sediment

Resultierend aus diesen Untersuchungen muss festgestellt werden, dass ein prophylaktischer Einsatz der Proteasen bzw. im Falle eines Ausbruchs einer Erkrankung im Teich mit Fischen nicht möglich ist, da das Enzym die Fische schädigen kann. In fischfreien Gewässern (Teichwasser, Teichsediment) ist dies allerdings gut möglich. Fische sollten, ausgehend von diesen Ergebnissen, nicht vor 3 Tagen nach der Behandlung mit Proteasen in die Teiche gesetzt werden. Sichtbar wird, dass es im Teichsediment zu einer natürlichen Degradation des Enzyms als auch dessen Aktivität kommt und somit keine Schädigungen der Umwelt (Gewässer, Teichböden) induziert werden, wie es beim Einsatz von chemischen Desinfektionsmitteln der Fall ist.

### ***Befragung von Teichwirten im Hinblick auf deren Einstellung zur Anwendung von Proteasen zur Desinfektion***

Von Januar bis März 2017 wurde eine Befragung von 57 Karpfenteichwirten aus Nordbayern durchgeführt. Die Auswertung der Fragebögen ergab, dass von den befragten Teichwirten nur 14 % die Teichwirtschaft im Haupterwerb betreibt. Das spiegelt die Verhältnisse der traditionellen bayerischen Karpfenteichwirtschaft wider, die überwiegend im bäuerlichen Nebenerwerb ausgeführt wird. Für 16 % der Befragten stellen Fischviren allgemein ein großes Problem in der Karpfenteichwirtschaft dar. 44 % sehen jedoch Fischviren im eigenen Betrieb als geringeres Problem an. 40 % sehen es als unbekannt an, ob Fischviren ein Problem darstellen. Etwa 65 % der Befragten benutzen derzeit Desinfektionsmittel bei der Bewirtschaftung der Teiche zur Desinfektion des Bodens und etwa 54 % bringen Desinfektionsmittel in das Wasser aus. Der Grund für die Ausbringung der Desinfektionsmittel lag für 67 % in der Krankheitsprophylaxe. Die Befragung ergab, dass 93 % der Teichwirte vielleicht eine neue, umweltfreundliche Möglichkeit der Desinfektion (Enzyme) zur Bekämpfung von Fischviren anwenden würden. Dabei sollten die Kosten nach Meinung von 52 % der Teichwirte unter 100 €/ha liegen. 38 % der Befragten gaben an bereit zu sein, für eine Desinfektion zwischen 100 € - 500 €/ha und 10 % der Befragten zwischen 500 und 1000 €/ha auszugeben. Bei der Ausbringung würden 51 % das Streuen im festen Zustand bevorzugen, 47 % wären sowohl dem Streuen (fest) oder dem Spritzen (flüssig) gegenüber aufgeschlossen, während nur 2 % das Spritzen (flüssig) bevorzugen würden.

Neun Betrieben der Forellenteichwirtschaft wurden hinsichtlich der in den Betrieben üblichen Ausbringung von Präparaten zur Desinfektion sowie den Anforderungen an neue Desinfektionsmittel befragt. Der Großteil der befragten Betriebe führt die Forellenteichwirtschaft im Haupterwerb durch. Fast alle Befragten verwenden Desinfektionsmittel zur Desinfektion von Wasser, Teichböden oder Behältern (meistens Branntkalk, Wofasteril (PES), Formalin und Chloramin). Als Grund für die Ausbringung wird neben der reinen Prophylaxe auch auf bestehende Probleme bezüglich der Fischgesundheit hingewiesen. Alle Betriebe sind bereit oder evtl. bereit, neue und umweltfreundliche Desinfektionsmittel anzuwenden. Bei der Frage „Wie viel Euro würden Sie pro m<sup>2</sup> zu desinfizierender Fläche ausgeben“ antworteten alle Befragten, dass die Kosten weniger als 1 EUR pro m<sup>2</sup> betragen sollten, wobei davon zwei Befragte weniger als 0,1 EUR pro m<sup>2</sup> ausgeben wollten. Bezüglich der Anwendbarkeit des Produkts bevorzugen die meisten Befragten Präparate zum „Streuen (fest)“ und „Spritzen (flüssig)“. Nur ein Befragter bevorzugte ausschließlich Präparate zum Streuen (fest).

## 5. Diskussion der Ergebnisse

### **Wasserqualität und Bodenqualität**

Temperatur, Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Ammonium und andere Faktoren sind die wichtigsten Faktoren für die Wasserqualität im Hinblick auf die Fischzucht in Teichen. Nach unseren gemessenen und ermittelten Ergebnissen ist das hydrochemische Regime von Teichen sehr unterschiedlich und hängt von einer Reihe von Faktoren ab, wie dem Untergrund, der Beschaffenheit des Flusseinzugsgebiets, der geografischen Lage, den klimatischen Bedingungen, tageszeitlichen Veränderungen, menschlichen Aktivitäten und anderen Faktoren. Die Wassertemperatur ist ein wichtiger Faktor, der die biochemischen Prozesse in der aquatischen Umwelt beeinflusst. Die Wassertemperatur schwankt im Jahresverlauf erheblich. Von Juni bis August 2016 war die Temperatur bei den von uns durchgeführten Messungen in einem Bereich von 12 °C bis 29 °C. Die durchschnittliche Wassertemperatur während der Vegetationsperiode betrug  $21 \pm 3,1^\circ\text{C}$ . Unsere Werte für die Wassertemperatur während der Vegetationsperiode sind im Einklang mit den Ergebnissen in der Studie von Másilko *et al.* 2014. Anhand der von uns während der Vegetationsperiode überwachten Parameter wurde die größte Streuung der Werte beim Sauerstoffgehalt festgestellt.

Die Anwesenheit oder Abwesenheit von Sauerstoff im Wasser bestimmt, ob aerobe oder anaerobe Prozesse im Wasser stattfinden. Sauerstoff ist wichtig, um aerobe Prozesse bei selbstreinigenden Oberflächengewässern zu gewährleisten. Die von uns gemessenen Sauerstoffkonzentrationen in Teichen und Parzellen lagen zwischen 0,01 und 20 mg/l. Dies bedeutet, dass während der Vegetationsperiode sowohl oxische als auch nahezu anoxische Bedingungen festgestellt wurden. Es ist bekannt, dass die Konzentration von gelöstem Sauerstoff im Wasser das Auftreten verschiedener Formen von Substanzen im Wasser und ihre Toxizität für Fische und Wasserorganismen (z. B. Ammonium) beeinflusst.

Die pH-Werte zeigten ebenfalls eine große Streuung (6,7 - 10,5) auf. Es ist bekannt, dass der pH-Wert chemische und biochemische Prozesse im Wasser, Formen des Auftretens einzelner Substanzen und damit deren Auswirkungen auf Wasserorganismen signifikant beeinflusst. Die Oberflächengewässer haben meist einen pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 8,3 (mit Ausnahme von Torfmooren). In Teichen werden diese Werte vom Carbonatsystem bestimmt. Die Verschiebung in einen pH-Bereich über 8,3 ist auf die photosynthetische Aktivität von Phytoplankton und Wasserpflanzen zurückzuführen, die zu einem vollständigen Abbau von freiem  $\text{CO}_2$  und damit von  $\text{HCO}_3^-$  führen kann. Die pH-Werte können im Extremfall 11 betragen (Hartman *et al.* 2005). Unsere Messungen des pH-Wert im Jahr 2016 im Bereich von 6,7 und 10,5 stimmen mit denen von Hartman *et al.* (2005) überein. Für Fische liegt der optimale pH-Wert zwischen 6,5 und 8,5. Salmoniden reagieren jedoch empfindlicher auf einen hohen pH-Wert als Karpfen und sind resistenter gegen niedrigere pH-Werte. Darüber hinaus beeinflusst der pH-Wert die Toxizität einer Reihe anderer Substanzen, insbesondere Ammonium, erheblich. Ammonium kann anorganischen oder organischen Ursprungs sein. Ammonium organischen Ursprungs ist das primäre Zersetzungsprodukt pflanzlicher und tierischer Stoffe und kann aufgrund landwirtschaftlicher Tätigkeit in Oberflächengewässer gelangen. Unsere Werte lagen im Bereich von unter der Nachweisgrenze bis 5 mg/l. Die Mittelwerte der wichtigsten Wasserparameter in den Teichen entsprachen normalen Werten und lagen größtenteils innerhalb für Fische verträglichen Grenzen. Allerdings sind in Bezug auf die Desinfektion von Viren und auch im Hinblick auf die Enzymaktivität und Stabilität von Proteasen die unterschiedlichen Gehalte durchaus von Belang und

werden bezüglich der Wirksamkeit der Proteasen im Hinblick auf die Desinfektion an anderer Stelle durch die Projektpartner (FAU und FLI) diskutiert.

Auch die Ergebnisse für die Qualität der Teichböden sind sehr unterschiedlich und hängen von einer Reihe von Faktoren ab. Die höchsten Variationen wurden bezüglich der mikrobielle Aktivität und der mikrobiellen Biomasse beobachtet. Sie lagen bei der mikrobiellen Aktivität zwischen 6,20 (VOL O<sub>2</sub> ml/3min) und 208,80 (VOL O<sub>2</sub> ml/3 min) und bei der mikrobiellen Biomasse zwischen 168 (µgC/gTS) und 1993 (µgC/gTS). Für die Desinfektion maßgebliche Parameter sind auch der pH-Wert sowie möglicherweise der Gehalt an organischer Substanz. Die pH-Werte variierten in gefüllten Teichen von 4,6 bis 7,6 im Zeitraum von Mai bis November. Sie bewegten sich in einem ähnlichen Bereich wie die pH-Werte in Teichböden nach dem Ablassen des Wassers im Herbst (Oberle *et al.* 2016) mit durchschnittlich 6,3 (4,8 – 7,8). Dieser Bereich des pH-Wertes hat bezüglich der Desinfektion und der Ausbringung an Desinfektionsmitteln wie Branntkalk große Auswirkungen im Hinblick auf die anzuwendenden Mengen (Oberle *et al.* 2019a). Ebenso sind Auswirkungen bezüglich der Wahl von Proteasen und deren zu empfehlender Dosierung zu erwarten.

### ***Proteolytische Aktivität der ausgesuchten Enzyme***

Das Ziel dieser Studie war es zu prüfen, ob Enzyme, die den Proteinabbau katalysieren, eine Alternative zu den klassischen Desinfektionsmitteln für die Inaktivierung von KHV, VHSV und IHNV darstellen können. Bei der Anwendung des meistverbreiteten Desinfektionsmittels in der Fischzucht (Branntkalk) wird die Inaktivierung durch das Erhöhen des pH-Wertes (> 12) und die basische Hydrolyse von organischen Verbindungen hervorgerufen, die zur Zerstörung der Pathogene führt. Gleichzeitig bewirkt die, durch die Reaktion mit Wasser erzeugte Wärme eine Temperaturerhöhung, die zur Beschleunigung der Hydrolyse beiträgt. Aufgrund dessen, dass diese Wirkung nicht selektiv ist, werden dabei nicht nur die Pathogene wie z.B. Viren, sondern auch die Mikroflora des Teiches zerstört. Da alle drei für diese Studie ausgesuchten Viren eine Hülle mit Proteinen besitzen und diese eine Rolle beim Eindringen in die Wirtszellen spielt bzw. spielen kann, kann das Zerstören der Proteine die Aufnahme der Viruspartikeln hindern und somit die Infektiosität des Virus auslöschen.

Proteasen sind Biokatalysatoren, die die partielle (selektive) sowie quantitative (nicht selektive) Hydrolyse von Proteinen beschleunigen. Dabei sind diese Katalysatoren so effizient, dass die Reaktion bei deutlich sanfteren Bedingungen, als bei chemischer Katalyse, stattfindet (z.B. ist keine drastische pH-Verschiebung nötig). Hierbei wird die Reaktionsgeschwindigkeit von pH-Wert, Temperatur, Salzkonzentration, Konzentration der Protease sowie der Proteine und anderen Substanzen (Inhibitoren), die diese Reaktion verlangsamen/ausschalten können, beeinflusst. Darüber hinaus sind Enzyme als Proteine biologisch abbaubar und würden das Ökosystem nicht dauerhaft beeinflussen. Zusätzlich ist deren Nutzung in vielen Bereichen, wie z.B. Lebensmitteltechnologie/Waschmittel, zugelassen und bereits gut etabliert. In diesem Forschungsvorhaben wurde untersucht, unter welchen Bedingungen der enzymatische Verdau der Virushüllproteine die Zielviren inaktiviert und inwieweit diese unter Umweltbedingungen Anwendung finden können. Dabei wurden zwei Proteaseformulierungen ausgesucht, die kommerziell verfügbar sind bzw. eine, die aus einer nativen Quellen gewonnen wird. Es wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, dass alle drei Proteasen die Zielproteine nicht selektiv hydrolysieren und ihre Anwendung in anderen Bereichen bereits zugelassen ist.

Da die proteolytische Aktivitäten der hier benutzten Enzyme mit unterschiedlichen Verfahren und unter verschiedenen Bedingungen (die teilweise nicht angegeben sind) gemessen wurden, ist der

Vergleich der Proteasen nur anhand der vom Hersteller angegebenen Aktivitäten der Formulierungen nicht möglich. Um diesen Vergleich zu ermöglichen, wurde die proteolytische Aktivität der Neutrase® und Alcalase® mit Hilfe von *Protease assay kit Fluorometric-Red, Abcam* in Reinstwasser bei 25 °C (wie bei den Inaktivierungsversuchen) in Relation zur Aktivität von Trypsin bei 37 °C bestimmt.

Die gemessene Enzymaktivität beschreibt hierbei, wie viel aktives Enzym sich in einer Enzym-Präparation befindet. Diese ist in Unit (U) angegeben, wobei 1 U als diejenige Menge Enzym definiert ist, welche unter angegebenen Bedingungen ein Mikromol Substrat (im Falle von Proteasen - Proteine) pro Minute umsetzt: 1 U = 1 µmol/min. Um die Aktivität von Proteasen zu bestimmen, werden Proteine (Substrate) mit fluoreszierenden Gruppen versetzt (an den Proteinen gebunden). Ist das Protein vollständig (nicht verdaut) wird der Fluoreszenzsignal unterdrückt. Bei der katalysierten Hydrolyse von Substratproteinen werden die Gruppen freigesetzt und ein Fluoreszenzsignal kann gemessen werden.

Im verwendeten Aktivitätsassay wurde die, anhand des oben beschriebenen Protokoll gemessene proteolytische Aktivität der Alcalase® ( $4 \cdot 10^6$  U/ml) nicht nur deutlich höher als die vom Hersteller angegebene volumetrische Aktivität (0,24 U/ml) bestimmt, sondern auch um Faktor 100 höher als die mit dem gleichen Protokoll gemessene Aktivität der Neutrase® ( $4 \cdot 10^4$  U/ml). Dieses korreliert sehr gut mit den im Projekt durchgeführten Virusinaktivierungsversuchen in denen gezeigt werden konnte, dass die Menge der Neutrase®, die zur Desinfektion der Zielviren bei 25 °C benötigt wird, im Vergleich zur Alcalase® bis zu ca. 100-fach höher sein kann.

Bei Neutrase® und Alcalase® liegt das Temperaturoptimum laut Herstellerangaben bei respektive 25 – 55 °C bzw. 30 – 65 °C. Da wie oben beschrieben im Aischgrund und in der Oberpfalz von Mai bis September Wassertemperaturen zwischen etwa 10 und 30 °C zu erwarten sind, wurden in der Studie die Aktivitäten der verwendeten Enzymformulierungen bei den Temperaturen zwischen 15 und 35 °C verglichen. In beiden Fällen lag die Aktivität der Enzyme bei 15 °C bei ca. 70 bis 80 % im Vergleich zu deren Aktivität bei 30 °C. Die etwas niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit bei niedrigeren Temperaturen bedeutet, dass bei solchen Temperaturen mehr Proteasen bzw. längere Reaktionszeit benötigt werden um die Proteine zu verdauen und folglich die Zielviren zu inaktivieren. Diese Beobachtung stimmt ebenfalls mit den Virusinaktivierungsversuchen bei 8 und 25 °C sehr gut überein.

Wie bereits beschrieben, variieren auch die pH-Werte in Teichwasser im Wandel der Jahreszeiten. Der durchschnittliche pH-Wert, der in Teichwasserproben gemessen wurde, lag bei 7,9 (Median 7,8), wobei Werte zwischen pH 6,7 und 10,5 gemessen wurden. Laut den Angaben der hier benutzten Proteaseformulierung liegt das pH-Optimum von Neutrase® zwischen pH 5,5 und 7,5 und von Alcalase® zwischen 7,0 und 9,0. Da das eingesetzte Proteaseaktivität-Assay mit pH-Werten unterhalb und oberhalb von 7 nicht kompatibel ist wurde die Aktivität der Enzyme über ein hier etabliertes Protokoll mit Hilfe vom Standardprotein (BSA) und Gelelektrophorese überprüft (SDS-PAGE). Dabei konnte bei 8 °C und 24-h Inkubation der Verdau des Standardproteins mit Neutrase® bei allen pH-Werten nachgewiesen werden. Bei Alcalase® deren pH-Optimum bei etwas höheren pH-Werten liegt war der Verdau vom BSA bei pH 7,4 und 8,0 effizienter als bei pH 5,0 und 6,0 was für die Anwendung des zweiten Enzyms in Teichwasser spricht.

Die Untersuchung der proteolytischen Aktivität von Neutrase® und Alcalase® in Teichwasser (steril/unsteril) zeigte, dass beide Formulierungen bei ca. 20 °C und natürlicher Belichtung bereits nach einer Woche inaktiviert werden. Da sowohl die hier durchgeführten Verdauprobungen mit



Standardprotein als auch Virusinaktivierungsversuche gezeigt haben, dass bereits wenige Minuten bis Stunden für die Inaktivierung der Zielviren ausreichend sind, stellt der Verlust der proteolytischen Aktivität nach ein paar Tagen kein Problem bei der Anwendung als Desinfektionsmittel dar. Im Gegenteil deutet es darauf hin, dass keine weiteren Maßnahmen zur Inaktivierung der Proteasen notwendig wären und keine bleibenden Einflüsse zu erwarten sind.

### **Proteasen zur Desinfektion von KHV, VHSV, IHNV und IPNV**

Die Inaktivierungsversuche mit Neutrase<sup>®</sup>, Alcalase<sup>®</sup> und Papain und KHV, VHSV und IHNV bei 8 und 25 °C und 24-h Inkubation haben gezeigt, dass alle drei Proteasen diese Viren tatsächlich inaktivieren können (Titerreduktion über mehrere Potenzen), was die These unterstützt, dass das Zerstören von Proteinen der Virushülle zu Verlust der Infektiosität von umhüllten Viren führen kann. Unter Laborbedingungen und bei den untersuchten Konzentrationen der Proteasen konnte die Desinfektion ( $T_R > 4$ ) am häufigsten mit Neutrase<sup>®</sup> erreicht werden. Lediglich für IHNV bei 8 °C wurde eine Titerreduktion von 4-Potenzen nicht erreicht ( $T_R = 2,8$ ). Das korreliert sehr gut mit der Untersuchung der proteolytischen Aktivität von Neutrase<sup>®</sup> die bei 15 °C etwa 70 % der Aktivität im Vergleich zu 25 °C gezeigt haben. Da trotz der niedrigen Temperatur eine Reduktion des Titers von IHNV von ca.  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml auf ca.  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml verzeichnet wurde, müsste die Behandlung mit höherer Konzentration bzw. mit längerer Inkubation erfolgen um die Desinfektion bei dem Virus mit Neutrase<sup>®</sup> auch zu erreichen. Bei der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Inaktivierung zeigte sich, dass vor allem bei etwas höherer Temperatur (25 °C) die Desinfektion bereits nach 30 min verzeichnet werden kann (KHV bei 8 und 25 °C, IHNV bei 25 °C). Durch die Untersuchung von Neutrase<sup>®</sup>- Behandlung von Viren bei verschiedenen pH-Werten (8 °C, 24 h) konnten die Ergebnisse aus vorherigen Experimenten bestätigt werden. Während alle drei Viren - KHV, VHSV und IHNV – nach der Inkubation mit der Protease eine Titerreduktion um mindestens 3-Potenzen erfuhren, war der Inaktivierungseffekt vor allem bei VHSV und IHNV bei pH 5 und 6 stärker als bei pH 7,4 und 8, was gut mit dem für das Produkt angegebenen pH-Optimum korreliert. Dieses Ergebnis wurde auch durch die Ergebnisse der Protease Behandlung in sterilen Wasserproben aus einer Karpfenteichanlage (pH 9,2) und einer Forellenanlage (pH 7,9) bestätigt. Trotz relativ hohen pH-Werten der Umweltproben konnte nach der Inkubation mit Neutrase<sup>®</sup> (24 h, 8 °C) in beiden Proben eine Titerreduktion von  $> 4$  für KHV und von  $\geq 2,5$  für VHSV gemessen werden. Lediglich für IHNV wurde mit Neutrase<sup>®</sup> in den Wasserproben keine Reduktion des Titers verzeichnet, was jedoch durch eine Kombination des Einflusses von der niedrigen Temperatur bei der Inkubation und relativ hohen pH Werten ( $> 7,4$ ) erklärt werden kann. Abschließend lässt Neutrase<sup>®</sup> die Vermutung zu, dass mit dieser Protease eine Desinfektion von KHV, VHSV und IHNV auch unter umweltrelevanten Parametern (Temperatur, pH, Matrix) gewährleistet werden kann.

Alcalase<sup>®</sup> zeigte bereits bei der *in vitro* Toxizitätsuntersuchungen eine höhere (Faktor 100) proteolytische Aktivität. Diese wurde sowohl durch die Messung der Aktivität mit Protease-Assay als auch in den Inaktivierungsversuchen mit verschiedenen Konzentrationen der Protease und KHV, VHSV und IHNV (bei 8 und 25 °C, 24 h Inkubation) bestätigt. Mit der höchsten in dem *in vitro* Testsystem einsetzbaren Konzentration von der Protease ( $0,08 \text{ mg}_{\text{Enzymlösung}}/\text{ml}$ ) konnte die Desinfektion bei 25°C für KHV und VHSV erreicht werden. Bei den Untersuchungen bezüglich der benötigten Einwirkzeit konnte bei dieser Konzentration und 25 °C auch IHNV nach einer Inkubation von 4 h inaktiviert werden. Eine Inkubation von KHV, VHSV und IHNV mit Alcalase<sup>®</sup> ( $0,08 \text{ mg}_{\text{Enzymlösung}}/\text{ml}$ ) bei den pH-Werten zwischen 5 und 8 (8 °C, 24 h) führte bei allen Viren und pH-Werten zu einer Reduktion des Titers um mindestens ca. 3-Potenzen, was auf einen niedrigeren Einfluss des pH auf die Protease im Vergleich zu Neutrase<sup>®</sup> in dem untersuchten Bereich hindeutet. Das stimmt gut mit den Ergebnissen überein, die

mit Hilfe von Standardprotein und SDS-PAGE mit Alcalase bei verschiedenen pH-Werten ermittelt wurden. Die Inaktivierung der Zielviren mit Alcalase (8 °C, 24 h) in den Umweltproben aus einer Karpfenteichanlage und einer Forellenanlage resultierte in  $T_R$ -Werten zwischen 1,8 (IHNV) und 3,7 (KHV). Die Abweichungen bei der Titerreduktion können sich zum einem durch eine relativ hohe Unsicherheit der Virustitration (Endpunktverdünnung mit statistischer Auswertung) bzw. durch eine erschwerte Temperaturkontrolle bei der Durchführung der Experimente erklären. Wie auch hier gezeigt, können die durch die Enzyme katalysierten Reaktionen sehr rasch bzw. mit sehr hohen Reaktionsgeschwindigkeiten erfolgen. Dabei ist es möglich, dass bereits eine kurzzeitige Erwärmung der Probe die Aktivität der Protease erhöht und die Reaktion beschleunigt.

Das aus nativer Quelle gewonnene Protease – Papain – konnte zwar bei ca. 2 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml auch den Titer von KHV, VHSV und IHNV um etwa 4-Potenzen reduzieren, jedoch nur bei 25 °C. In Anbetracht der aufwändigen Aufreinigung und den damit verbundenen hohen Produktionskosten sowie fraglicher Nachhaltigkeit einer solchen Herstellung, wurde die Protease nach den Ergebnissen zur Anwendung als Desinfektionsmittel nicht weiter untersucht. Im Vergleich dazu werden die zwei anderen Produkte mit Hilfe von nachhaltigen biotechnologischen Prozessen hergestellt und finden breite Anwendung z.B. in Waschmittel oder bei der Lebensmittelherstellung.

Unter den hier untersuchten Viren scheint das KHV am empfindlichsten auf die Behandlung mit Proteasen zu reagieren. Die Titerreduktion dieses Virus um mindestens 4-Potenzen wurde bei den unterschiedlichen getesteten Parametern am häufigsten und sehr rasch erreicht. Das stimmt gut mit den vorherigen Erkenntnissen über dieses Pathogen überein (Mletzko *et al.* 2016, Amtmann *et al.* 2019).

Weiterhin bestätigen die Untersuchungen der Stabilität aller drei Fischviren – KHV, VHSV und IHNV – in verschiedenen sterilen und unsterilen Wasserproben inkl. Umweltproben aus einer Forellenanlage und einer Karpfenteichanlage diese Erkenntnisse ebenfalls. Trotz konstanter Temperatur und Lichtausschluss nahm die Infektiosität des KH-Virus vor allem in nicht sterilen Wasserproben rasch ab. Ohne bakterielle Belastung scheint auch der pH-Wert die Infektiosität des Virus im Wasser zu beeinflussen – eine Titerreduktion erfolgte schneller in sterilem Wasser bei pH 9,2 als im Vergleich zu anderen sterilen Wasserproben. Trotzdem konnte das KHV bis zur 48 h in den Wasserproben dessen Infektiosität behalten. Diese Daten sind in einer guten Übereinstimmung mit den Daten von Shimidzu *et al.* 2006, die beschrieben, dass KHV maximal bis zu 3 Tagen in den Umweltwässern aktiv verbleiben kann. Ähnliche Effekte wurden hier auch für VHSV und IHNV beobachtet: Die Infektiosität beider Viren nahm in den unfiltrierten Umweltproben ebenfalls schneller ab als in den sterilen Proben, was gut mit den für VHSV und IHNV veröffentlichten Daten übereinstimmt (Hawley & Garver 2008, Mori *et al.* 2002, Kamei *et al.* 1988). Es wird dabei vermutet, dass unter anderem die Anwesenheit von Bakterien in unfiltrierten Umweltproben eine Rolle bei der Inaktivierung von Viruspartikeln spielt.

Allerdings darf man nicht vergessen, dass sowohl in den verschiedenen Teichen, als auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Zusammensetzung der Wässer (sowie der Bakterien die darin vorhanden sind) sehr unterschiedlich sein kann und somit auch die Stabilität der Viren entsprechend variiert. Dazu können die Fische bereits bei sehr niedrigen Viruspartikelkonzentrationen infiziert werden. Beispielsweise zeigten Gilad *et al.* (2003), dass bereits 1,2 TCID<sub>50</sub>/ml von KHV im Wasserbad in einer Infektion und einem Krankheitsausbruch in den untersuchten Fischen resultierte. Darüber hinaus reichen dem Virus auch sehr kurze Expositionszeiten (ca. 1 h), um in den Wirt einzudringen (Gilad *et al.* 2003). Aus diesem Grund ist eine effiziente und rasche Inaktivierung des Virus unbedingt wichtig, um die Infektion von Fischen zu vermeiden und die Verbreitung des Pathogens zu

unterbinden. Wie in dieser Arbeit gezeigt, kann dies unter bestimmten Voraussetzungen auch mit Hilfe von Proteasen erreicht werden.

Beim IPNV zeigten die Versuche zur Inaktivierung von hohen Titern mit  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml als auch niedrigen Titern von  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml mit Neutrase® (beginnend mit 50 mU/ml für die Inaktivierung und nach Verdünnung 1:10 auf 5 mU/ml für das Bad der Fische) im Hälterungswasser keine Erfolge. Die geprüften Proteasen in der gewählten Konzentration waren nicht in der Lage, das IPNV als nicht umhülltes Virus so zu schädigen, dass keine Replikation in der Zelle und im Fisch stattfinden konnte. Wurden die Konzentrationen deutlich höher als 50 mU/ml gewählt, kam es zur Schädigung und Proteolyse der IPNV. Diese Konzentrationen waren jedoch extrem zelltoxisch und wurden nicht weiter angewandt.

### ***Toxikologische Untersuchungen des Einflusses von Proteasen auf Zoo- und Phytoplankton sowie Organismen des Teichbodens***

Ein Teilziel dieses Projektes ist es, die Auswirkungen von Proteasen - als Alternative für Desinfektionsmaßnahmen in der Teichwirtschaft gegen Fischviren - auf Zooplankton, Phytoplankton und Organismen des Teichbodens zu untersuchen. Die Mortalität von Zooplankton, Phytoplankton und *Chironomiden*larven nahm mit zunehmender Konzentration im Teichwasser für die Enzyme Alcalase® und Neutrase® kontinuierlich zu. Die Ergebnisse stimmen mit denen der Untersuchungen der Auswirkung der Proteasenkonzentrationen auf Zellkulturen (FAU) überein, wo gleichermaßen die Zellmortalität mit steigender Proteasekonzentration zunimmt.

Die Arbeiten der BVT ergaben, dass zur wirksamen Desinfektion mindestens 53 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml Neutrase® und 0,08 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml Alcalase® erforderlich sind. Um sicher zu stellen, dass die Desinfektion unter realen Bedingungen erreicht wird, sollte man mindestens die doppelte Menge des Enzyms einsetzen. Umgerechnet auf ein Liter Wasser ergeben sich ca. 100 g<sub>Enzymlösung</sub>/l Neutrase®. Bei Alcalase® sollte die Menge ebenfalls erhöht werden, da die Desinfektion bei 0,080 mg<sub>Enzymlösung</sub>/ml nur bei 25°C und KHV und VHSV erfolgreich war. Bei einer Erhöhung um Faktor 2,5 ergibt sich 200 mg<sub>Enzymlösung</sub>/l für Alcalase®.

Die EC- Werte bei Neutrase® lagen für das Benthos (10 Tage, EC25) bei 607 mg<sub>Enzymlösung</sub>/l, bei Phytoplankton bei 183 mg<sub>Enzymlösung</sub>/l (72h-EC50-Werte) und bei Zooplankton bei 471 mg<sub>Enzymlösung</sub>/l (48h-EC50-Werte). Bezüglich der Neutrase® liegen die zur Desinfektion von Fischviren benötigte Konzentration deutlich über den Konzentrationen, die für Benthos und Phyto- und Zooplankton als verträglich gelten können. Die EC- Werte bei Alcalase® lagen für das Benthos (10 Tage, EC25) bei 507 mg<sub>Enzymlösung</sub>/l, bei Phytoplankton bei 374 mg<sub>Enzymlösung</sub>/l (72h-EC50-Werte) und bei Zooplankton bei 128 mg<sub>Enzymlösung</sub>/l (48h-EC50-Werte).

Dementsprechend liegt die zur Desinfektion von Fischviren geschätzte Konzentration dieser Protease (ca. 200 mg<sub>Enzymlösung</sub>/l) in einem weit verträglicheren Bereich als im Falle der Neutrase®. Somit erscheint die Anwendung von Alcalase® im Hinblick auf die benötigten Mengen und die Verträglichkeit auf Benthos, Phyto- und Zooplankton deutlich im Vorteil im Vergleich zur Neutrase®. Nichtsdestotrotz sind bei beiden Proteasen, im Vergleich zu den in der Praxis üblichen Desinfektionsmitteln, wie Branntkalk und den hier bei der Desinfektion zu erzielenden pH-Werten von 12, weniger Auswirkungen auf das gesamte Ökosystem zu erwarten. Dennoch, um zu prüfen ob die geschätzten Mengen der Proteasen® bei der Desinfektion von Teichanlagen tatsächlich ausreichend und umweltfreundlicher sind, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Während des Toxizitätstests mit *Daphnien* nahm der Sauerstoffgehalt und der pH-Wert mit zunehmender Proteasekonzentration am Ende des Versuchszeitraumes ab. Außerdem wurden *Daphnien* mit zunehmenden Konzentrationen teilweise oder vollständig abgebaut. Diese Abbauprozesse sind vermutlich die Folge der proteolytischen Aktivität der Enzyme und die Ursache für den sinkenden Sauerstoffgehalt im Wasser. Darüber hinaus kann ein rascher Proteinabbau zu einem Absinken des pH-Werts führen. Ebenso sanken beim Versuch bezüglich der Ausbringung von Proteasen auf *Chironomidenlarven* im Teichboden bei beiden Enzymen die mittleren Sauerstoffwerte mit zunehmender Enzymkonzentration. Sie waren hier allerdings zu Versuchsbeginn etwas niedriger als zum Ende des Versuchs. Dies liegt daran, dass während der Experimente die Versuchseinheiten (600 ml Bechergläser) belüftet und somit das Wasser mit Sauerstoff angereichert wurde. Dagegen stieg der pH-Wert (*Chironomiden*-test) am Ende des Versuchs mit steigenden Konzentrationen beider Enzyme leicht an. Letzteres steht im Gegensatz zu den früheren Ergebnissen bei den Untersuchungen der Auswirkungen der Enzyme auf *Daphnien* im Hinblick auf den pH-Wert. Eine mögliche Erklärung ist, dass *Daphnien*-Experimente nur im Wasser durchgeführt wurden, während *Chironomiden*-Larven-Experimente mit Teichsedimenten und Teichwasser (Belüftet) durchgeführt worden waren und Teichböden möglicherweise eine gewisse Pufferkapazität aufweisen. Darüber hinaus können die beiden Enzyme und dass in den Formulierungen enthaltene Glycerin möglicherweise ein „Medium“ für andere Mikroorganismen sein. Unsere Ergebnisse bezüglich der Auswirkung der Proteasen auf die mikrobielle Biomasse waren nach der Applikation von Neutrase® im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht (nach einem Tag bzw. einem Monat). Es scheint so zu sein, dass vor allem die Neutrase®-Formulierung ein „Nährmedium“ für Mikroorganismen darstellen kann.

### ***Befragung von Teichwirten im Hinblick auf deren Einstellung zur Anwendung von Proteasen zur Desinfektion***

In den Jahren 2017 und 2018 wurden Befragungen von insgesamt sechshundsechzig Karpfenteichwirten und Besitzern von Forellenteichen in Bayern durchgeführt. Zusammengefasst kann konstatiert werden, dass die Teichwirte sehr offen für innovative Maßnahmen im Bereich der Desinfektion der Teiche sind. Obwohl nach Ansicht der Befragten Fischviren kein großes Problem darstellen, werden Desinfektionsmaßnahmen sehr häufig prophylaktisch angewandt. Neben der Effektivität der Behandlung spielen ökonomische Aspekte eine sehr große Rolle und müssen bei der Etablierung neuer Methoden in Betracht gezogen werden.

## **6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse.**

Die hier dargelegten Daten belegen, dass proteolytische Enzyme in der Tat in der Lage sind, umhüllte Viren in wässrigen Lösungen zu inaktivieren. Je nach Virus und Rolle von deren Hüllenproteinen bei der Infektion, kann dies mit unterschiedlicher Effizienz erfolgen. Wie in dieser Arbeit gezeigt, konnten die hier ausgesuchten Proteaseformulierungen Neutrase® und Alcalase® in Laborversuchen unter verschiedenen Bedingungen (wie pH, Temperatur, Matrix), die den realen Parametern entsprechen, den Titer von Zielviren – KHV, VHSV, IHNV um mehrere Potenzen teilweise bis unter die Nachweisgrenze des Tests reduzieren. Somit ist das Ziel des Vorhabens erreicht und das Potenzial der Proteasen als alternative Desinfektionsmittel gegen diese Viren bestätigt. Des Weiteren zeigen unsere Daten, dass Proteasen auch in realen Teichwässern diese Erreger rasch inaktivieren können und anschließend selbst inaktiviert werden, sodass keine bleibenden Effekte auf die Umwelt nach deren Anwendung zu erwarten sind.

Nichtsdestotrotz weisen die Proteasen wie erwartet sowohl in *in vitro* Versuchen als auch bei Benthos, Zoo- und Phytoplankton toxische Effekte auf. Da diese toxischen Effekten aufgrund der Konzentrationen der beiden Proteasen hervorgerufen werden und in etwa demselben Bereich liegen, jedoch für die Desinfektion niedrigere Mengen von Alcalase® abgeschätzt werden können, weist diese Enzymformulierung Vorteile im Vergleich zu Neutrase® auf. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen bezüglich der Auswirkung nach der Anwendung von Proteasen im Ökosystem Teich notwendig und die Erstellung einer Empfehlung für die Praxis zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

Neben den ökologischen Aspekten spielen auch ökonomische Betrachtungen bei der Nutzung von Proteasen als Desinfektionsmittel eine wichtige Rolle. Um die Wirksamkeit der Behandlung unter realen Bedingungen sicher zu stellen, werden höhere als die hier ermittelten Konzentrationen der Enzyme bzw. andere Formulierungen (mit höherer Aktivität, auch als Trockensubstanz verfügbar) benötigt. Die für die beabsichtigte Anwendung ausgesuchten Enzyme sollten nicht nur die Zielviren effizient inaktivieren, sondern auch in größeren Mengen und einfach zugänglich sein. Trotz der verbreiteten Anwendung von Proteasen, z.B. in der Lebensmittelindustrie oder in Waschmitteln, sind diese nicht allgemein zugänglich. Dadurch ist die Ermittlung der realen Kosten für Proteasen aufgrund der Geheimhaltung der Produzenten erschwert. Die Enzymformulierungen, die in dieser Studie verwendet wurden, wurden für Forschungszwecke als flüssige Produkte über Fa. Sigma-Aldrich erworben, somit können diese Preise nicht als Basis für eine realistische ökonomische Bewertung des Prozesses herangezogen werden.

Demnach konnten die hier durchgeführten Untersuchungen zwar das Potenzial der Proteasen zur Nutzung als Desinfektionsmittel gegen KHV, VHSV und IHNV bestätigen, für die praktische Anwendung werden jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

## **7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen**

Das Ziel des Vorhabens war, die Möglichkeit einer Anwendung von ausgesuchten Proteasen zur Desinfektion verschiedener viraler Erreger in Laborversuchen unter umweltrelevanten Rahmenbedingungen zu untersuchen. Wie oben beschrieben, konnte eine Inaktivierung der hier ausgesuchten Viren – KHV, VHSV und IHNV – durch die Behandlung mit verschiedenen, sowohl biotechnologisch hergestellten als auch nativen Proteasen, unter verschiedenen Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Matrix und Dauer der Behandlung, gezeigt werden. Demnach ist das Potential der Proteasen zur Nutzung als innovative und alternative Desinfektionsmittel bestätigt. Gleichwohl, um einen solchen Prozess in der Praxis etablieren zu können, sind weitere Studien bezüglich der Wirksamkeit unter realen Gegebenheiten, z.B. in einem Teich nach Ausbruch der von den Zielviren hervorgerufenen Krankheit, notwendig. Dazu sollten am besten die Proteasen mit einem klassischen Desinfektionsmittel wie z.B. Branntkalk verglichen werden und bezüglich der Wirksamkeit, des Einflusses auf das gesamte Biom des Teiches unter besonderer Berücksichtigung der Naturnahrung (Zoo- und Phytoplankton, Benthos), sowie der Kosten bewertet werden.

## **8. Zusammenfassung**

Auf der Suche nach neuen, umweltfreundlichen und nachhaltigen Desinfektionsmitteln, die nach Ausbruch einer viralen Infektion in Fischteichanlagen eingesetzt werden könnten, wurden in dieser Studie verschiedene Proteasen und deren Auswirkungen auf die Infektiosität von Fischviren untersucht. Dabei musste zum einem geprüft werden inwieweit der Verdau von Virusproteinen die

Infektion mit den ausgesuchten Viren verhindern und unter welchen Prozessrandbedingungen das bewerkstelligt werden kann. Dafür wurden als Zielviren verschiedene umhüllte (KHV, VHSV, IHNV) und nicht umhüllte Viren (IPNV) ausgesucht, welche die zwei wichtigsten in Deutschland in der Aquakultur vertretenen Fischarten (Karpfen – KHV, Forellen – VHSV, IHNV, IPNV) befallen können. Im Hinblick auf die beabsichtigte Anwendung wurden für die Untersuchungen proteolytische Enzyme, sogenannte Proteasen, ausgewählt, die folgende Kriterien erfüllen. Zu einem sollten sie in der Lage sein unter ausgesuchten Rahmenbedingungen die Hydrolyse von Virusproteinen zu katalysieren und in Folge dessen die Infektiosität der Viren auszulöschen. Zusätzlich sollten sie kommerziell, beziehungsweise aus nativen Quellen in größeren Mengen verfügbar sein und im günstigsten Fall bereits zur Anwendung in der Lebensmittelproduktion zugelassen sein. Des Weiteren sollten sie nach der Anwendung ihre proteolytische Aktivität rasch verlieren, sodass sie im Anschluss an die Desinfektion biologisch abgebaut werden können und keine bleibende Effekte auf die Umwelt hinterlassen. Drei Proteasen wurden hier für die beabsichtigte Anwendung untersucht. Zwei davon Neutrase® und Alcalase® sind kommerziell verfügbar, finden breite Anwendung und werden biotechnologisch hergestellt. Papain ist ein bekanntes Enzym mit vielfältigem Einsatzspektrum und wird aus einer nativen Quelle – der Papaya-Frucht – gewonnen.

Als erstes wurden Wasser- und Bodenproben in den umliegenden Fischteichen untersucht, um deren Qualität und den daraus möglicherweise resultierenden Stressfaktor für die darin lebenden Fische abzuschätzen. Darüber hinaus wurden dabei Umweltparameter, wie Temperatur und pH-Wert ermittelt, bei denen im Falle einer Virusinfektion eine Desinfektion durchzuführen wäre. Diese wurden im späteren Verlauf des Projektes für die Proteasebehandlung in Laborversuchen untersucht. Wie erwartet, zeigten die hier gemessenen Werte eine relativ große Bandbreite die von vielen Faktoren, wie z.B. dem Untergrund, der Beschaffenheit des Flusseinzugsgebiets, der geografischen Lage, den klimatischen Bedingungen, tageszeitlichen Veränderungen und menschlichen Aktivitäten abhängig ist. Die zwischen Juni und August ermittelten Wassertemperaturen bewegten sich zwischen 12 °C und 29 °C, wobei die durchschnittliche Wassertemperatur  $21 \pm 3,1^\circ\text{C}$  betrug. Der in dieser Periode gemessene Sauerstoffgehalt zeigte eine große Streuung und lag zwischen 0,01 und 20 mg/l. Die pH-Werte erstreckten sich ebenfalls über eine große Bandbreite (pH 6,7 - 10,5). Nichtsdestotrotz lagen die Mittelwerte der wichtigsten Wasserparameter in den Teichen im normalen und für die Fische verträglichen Bereich. Was eine Schlussfolgerung zulässt, dass die untersuchten Teichanlagen von guter Qualität sind und die darin gehaltenen Fische wenigen Stressfaktoren ausgesetzt sind.

Die für diese Forschungsvorhaben ausgesuchten Proteaseformulierungen: Neutrase®, Alcalase® und Papain unterscheiden sich in ihren Aktivitätsoptima und ihrer proteolytischen Aktivität. Um diese Enzyme für die beabsichtigte Anwendung untereinander vergleichen zu können, wurde deren Aktivität unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die von uns bestimmte proteolytische Aktivität der benutzten Formulierungen korreliert sehr gut mit den Ergebnissen der Virusinaktivierungsversuche. Obgleich die verwendeten Proteasen in ihrem Temperaturoptimum über den ermittelten Wassertemperaturen der Teiche liegen, zeigten die Enzyme unter umweltrelevanten Parametern eine ausreichend gute Aktivität. So zeigen unsere Daten, dass eine Anwendung der ausgesuchten Enzyme mit den in der Umgebung in den Teichwässern ermittelten pH-Werten kompatibel ist. Schließlich konnten wir ebenfalls zeigen, dass die proteolytische Wirkung der Proteasen im Teichwasser rasch abnimmt, sodass keine zusätzlichen Maßnahmen zu deren Inaktivierung notwendig wären und keine bleibenden Einflüsse auf die Umwelt zu erwarten sind.

In den Laborversuchen konnten alle untersuchten Proteaseformulierungen die umhüllten Zielviren – KHV, VHSV und IHNV – inaktivieren. Dabei wurde die Desinfektion ( $T_R > 4$ ) am häufigsten bei der Behandlung mit Neutrase® erreicht. Darüber hinaus erfolgte die Inaktivierung der Viren sehr rasch (innerhalb von wenigen Stunden) und konnte auch bei den umweltrelevanten pH-Werten sowie in den Teichwasserproben erfolgreich durchgeführt werden.

Die für die Desinfektion ermittelten notwendigen Mengen der untersuchten Proteasen stimmen mit den Untersuchungen deren proteolytischen Aktivität und *in vitro* Toxizität überein. Im Vergleich zu Neutrase® wurde von Alcalase® eine deutlich niedrigere Konzentration zur Inaktivierung der Viren benötigt, was bei einer Anwendung im Teich für das zweite Enzym spricht.

Bezüglich der für die Vorhaben ausgesuchten Fischviren, scheint das KHV am empfindlichsten auf die Behandlung mit proteolytischen Enzymen zu reagieren, was den bereits veröffentlichten Daten entspricht.

Weiterhin wiesen KHV, VHSV und IHNV leicht unterschiedliche Stabilitäten in verschiedenen sterilen und unsterilen Wasserproben auf. Auch unter konstanter Temperatur und Lichtausschluss nahm die Infektiosität der Viren teilweise rasch ab. Einen noch schnelleren Verlust der Infektiosität konnte für alle Viren in nicht sterilfiltrierten Wasserproben aufgezeichnet werden, was ebenfalls mit den Literaturdaten übereinstimmt. Da jedoch die Stabilität der Viren in den Umweltwässern unterschiedlich stark durch die darin herrschenden Bedingungen beeinträchtigt werden kann und bereits wenige Viruspartikeln zur Infektion führen können, werden nach wie vor Maßnahmen zur Bekämpfung von Fischviren benötigt, die eine schnelle und effiziente Inaktivierung gewährleisten. Diese können wie hier dargelegt auch mit Hilfe von Proteasen erfolgen.

Wie erwartet zeigen Proteasen ihrerseits toxische Effekte, nicht nur in *in vitro*-Systemen, sondern auch auf verschiedene Vertreter der Zoo- und Phytoplankton sowie auf Organismen, die im Teichboden ihren Lebensraum haben. Die Konzentrationsgrenzen ab denen toxische, inhibitorische sowie letale Effekte von Neutrase® und Alcalase® auf Benthos, Zoo- und Phytoplankton beobachtet wurden, fielen im Vergleich zu den *in vitro* Untersuchungen überraschend ähnlich für beide Enzyme aus. Unter der Berücksichtigung der hier für die Desinfektion abgeschätzten Mengen an Proteasen, wäre eine Anwendung von Alcalase® zu bevorzugen, da die benötigte Menge leicht unter beziehungsweise im toxischen Bereich läge, während bei Neutrase® diese deutlich überschritten werden musste. Dennoch, um diese Schlussfolgerung zu prüfen, sind weitere Untersuchungen über die Anwendung von Proteasen zur Desinfektion in Teichanlagen notwendig.

Das IPNV, als nicht umhülltes Virus, erwies sich als sehr stabil und wurde durch die verwendeten Konzentrationen der Enzyme nicht beeinflusst.

Nichtdestotrotz weisen die Ergebnisse der unter den Teichwirten durchgeführten Umfragen darauf hin, dass sie für innovative Desinfektionsmaßnahmen offen sind und deren Wichtigkeit und Notwendigkeit erkennen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die vorgelegten Daten das Potenzial der Proteasen zur Anwendung als Desinfektionsmittel bestätigt haben, auch wenn weitere Forschung notwendig ist, um die verbleibenden offenen Fragen zu beantworten.

## 9. Literaturverzeichnis

- Adamson, N. J., & Reynolds, E. C. (1996). Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. *Enzyme Microbial Tech*, 19 (3), 202-207.
- Amtmann, A., Ahmed, I., Zahner-Rimmel, P., Jordan, L., Oberle, M., Wedekin, H., Christian, J., Bergmann, S., Becker, A. (2019). Virucidal effects of various agents - including protease - against koi herpesvirus and viral haemorrhagic septicemia virus. *J Fish Dis* 00:1-11.
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol & Biochem* 10 (3), 215-221.
- Aoki, T., Hirono, I., Kurokawa, K., Fukuda, H., Nahary, R., Eldar, A., Davison, A.J., Waltzek, T.B., Bercovier, H., Hedrick, R.P. (2007). Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J Virol* 81 (10), 5058–5065. doi: 10.1128/JVI.00146-07.
- Baur, W.H., und Rapp, J. (2003). „Gesunde Fische“, 2. Aufl. , Parey Buchverlag.
- Beck, T. (1971). Die Messung der Katalaseaktivität von Böden. *J Plant Nut & Soil Sci* 130 (1), 68-81.
- Bergmann, S.M., Lutze, P., Fischer, U., Dauber, M., Kempfer, J. (2010). Goldfisch (*Carassius auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease (KHVD) *Bull Europ Assoc Fish Pathol* 30 (2):74-83.
- Bootland L.M. & Leong J.C. (1999). Infectious hematopoietic necrosis virus. In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Woo P.T.K. & Bruno D.W., eds. CAB International, Oxon, UK, 57–121.
- Broschüre: Lebensmittelenzyme in der EU: Herstellung, Anwendungen, Marktsituation und rechtliche Regelungen. BL Dr. Ulrich Herzog, Dr. Armin Spök, Mag. Markus Proksch. Bundesministerium für Gesundheit, Sektion II, Radetzkystraße 2, A-1030 Wien.
- Enzmann, P.J., Bruchhof, B. (1989). Comparative studies on viral haemorrhagic septicaemia viruses and infectious haematopoietic necrosis virus. An attempt to demonstrate an immunological relationship. *Fish Health Prot Strateg*, 107–120.
- Friedrich-Löffler-Institut (FLI) (2014), Amtliche Methodensammlung, Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen, Stand 30.06.2014.
- Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) (2019). Amtliche Methodensammlung: Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden.
- Gilad, O., Yun, S., Adkison, M.A., Way, K., Willits, N.H., Bercovier, H., Hedrick, R.P. (2003). Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J Gen Virol* 84 (Pt 10), 2661–2667. doi: 10.1099/vir.0.19323-0.
- Guérard, F., Dufosse, L., De La Broise, D., & Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *J Molec Cat B: Enzymatic*, 11 (4-6), 1051-1059.
- Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *App Microbiol Biotech* 59 (1): 15 -32.



- Hartman, P., Příklad, I., Štědranský, E. (2005). Hydrobiologie. Informatorium, Prag, 359 S. [Auf Tschechisch].
- Hawley, L.M., Garver, K.A. (2008). Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Dis Aquatic Org* 82(3), 171–178. doi: 10.3354/dao01998.
- Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E., Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements: an automated technique based on infra-red gas analysis. *Plant & Soil* 116 (2), 191-195.
- HERA, Risk assesment executive summary, Substance group protease. <http://www.heraproject.com/ExecutiveSummary.cfm?ID=246>.
- Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Kimura, T. (1988). Effects of environmental water on the infectivities of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J Appl Ichthyol* 4 (1), 37–47. doi: 10.1111/j.1439-0426.1988.tb00546.x.
- Kielpinski, M., Kempter, J., Panicz, R., Sadowski, J., Schütze, H., Ohlemeyer, S., Bergmann, S.M. (2010). Detection of KHV in Freshwater Mussels and Crustaceans from Ponds with KHV History in Common carp (*Cyprinus carpio*) *Isr J Aquac Bamidgeh* 62 (1):28-37.
- Krishna, K. L., Paridhavi, M., & Patel, J. A. (2008). Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.). *Nat Prod Radiance* 7 (4), 364-373.
- Licek, E. (2011). „Tenazität von Fischviren und die Bedeutung für die Desinfektion in der Fischzucht“; Österreichs Fischerei, Jahrgang 64/2011 : 95-99.
- Másílko, J., Bláha, M., Hlaváč, D. (2014). The Effects of using mechanically modified cereals on the growth, feed conversion, fat content and fillet yield of market size common carp grown in ponds. *Turkisch J Fish Aquat Sci*, 15(3), 593-600.
- Merkblatt: Koi-Herpesvirus-Infektion (2009). Thüringer Ministeriums für Soziales, Familie und Gesundheit redaktionell überarbeitet und an die Gegebenheiten für das Land Sachsen-Anhalt. Stand 13.08.2009. [https://mule.sachsen-anhalt.de/fileadmin/Bibliothek/Politik\\_und\\_Verwaltung/MLU/MLU/03\\_Landwirtschaft/Landwirtschaft\\_SA/Fischerei/13\\_08\\_09\\_KHV-Merkblatt\\_Version2\\_65-2.pdf](https://mule.sachsen-anhalt.de/fileadmin/Bibliothek/Politik_und_Verwaltung/MLU/MLU/03_Landwirtschaft/Landwirtschaft_SA/Fischerei/13_08_09_KHV-Merkblatt_Version2_65-2.pdf)
- Minamoto, T., Honjo, M.N., Yamanaka, H., Tanaka, N., Itayama, T., Kawabata, Z. (2011). Detection of cyprinid herpesvirus- 3 DNA in lake plankton. *Res Vet Sci* 90: 530–532.
- Mletzko, A., Amtmann, A., Bergmann, S., Lee, P., Christian, J., Buchholz, R., & Becker, A. (2017). Inoculation of cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) on common carp brain cells—influence of process parameters on virus yield. *In Vitro Cell Develop Biol – Anim* 53 (7): 579-585.
- Mori, K.-I., Iida, H., Nishizawa, T., Arimoto, M., Nakajima, K. Muroga, K. (2002). Properties of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Isolated from Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol* 37(4), 169–174. doi: 10.3147/jsfp.37.169.
- Neukirch, M. (1999). Isolation of a virus from koi with altered gills. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 19 (5), 221–224.
- Oberle, M., Buchholz, R., Christian, J., Mletzko, A., Becker, A., Wedekind, H. (2016). Untersuchung der Qualität bayerischer Teichböden, Fischer & Teichwirt, Hrsg.: Verband Bayerischer Berufsfischer, Nürnberg, 67, 46 – 48.

- Oberle, M., Buchholz, R., Christian, J., Mletzko, A., Becker, A., Wedekind, H. (2019a). Untersuchungen zur Beschaffenheit von bayerischen Teichböden: Konsequenzen für die Desinfektion. Vortrag, 29. Bayerischer Tierärztetag: Tierärztliche Betreuung von Aquakulturanlagen, 01.06.2019, Nürnberg
- Oberle, Martin; Kallert, Dennis; Masilko, Jan; Loy, Christina and Wiesmeier, Martin (2019b): Steigerung der Naturnahrung zur Förderung einer nachhaltigen und ökologischen Produktion in der Karpfenteichwirtschaft. [Increasing the natural yield in carp ponds to promote sustainable and ecological carp farming, <https://www.orgprints.org/36507/>].
- OECD Guideline for Testing of Chemicals (2004), Section 2, No. 202, "Daphnia sp., Acute Immobilisation Test", 13<sup>th</sup> April 2004.
- OECD Guideline for Testing of Chemicals (2006), Section 2, No. 201: "Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test", 23<sup>rd</sup> März 2006.
- OIE, Manual of Diagnostic tests for Aquatic Animals (2012). [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/2.3.04\\_IHN.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.04_IHN.pdf)
- Perelberg, A., Smirnov, M., Hutoran, M., Diamant, A., Bejerano, Y., Kotler, M. (2003). Epidemiological Description of a New Viral Disease Afflicting Cultured *Cyprinus Carpio* in Israel. *Israeli J Aquacul* 55 (1), 5–12.
- Ramakrishnan, V. V., Ghaly, A. E., Brooks, M. S., & Budge, S. M. (2013). Extraction of oil from mackerel fish processing waste using Alcalase Enzyme. *Enzyme Eng*, 2 (2), 1-10.
- Reed, L. J., Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American J Hygiene* 27 (3).
- Regulaa, C., Carretiera, E., Wyarta, Y., Gésan-Guiziuoc, G., Vincent, A., Boudot, D., Moulin, P. (2014). Chemical cleaning/disinfection and ageing of organic UF membranes: A review. *Wat Res* 56, 325-365.
- Sawant, R., Nagendran, S. (2014). Protease: an Enzyme with Multiple Industrial Applications. *World J Pharm Pharmaceut Sci*, 3 (6), 568-579.
- Schütze, H., Enzmann, P.-J., Huchling, R., Mundt, E., Niemann, H., Mettenleiter, T. C. (1995). Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious hematopoietic necrosis virus. *J Gen Virol* 76, 2519-2527.
- Schütze, H. (2011). Fish Cells - Some remarks to induce discussion. European Union Reference Laboratory for Fish Diseases, 41–42.
- See, S. F., Hoo, L. L., & Babji, A. S. (2011). Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. *Int Food Res J*, 18 (4).
- Silva, J. D., Rashid, Z., Nhut, D. T., Sivakumar, D., Gera, A., Souza, M. T., & Tennant, P. (2007). Papaya (*Carica papaya* L.) biology and biotechnology. *Tree Forestry Sci Biotech*, 1(1), 47-73.
- Silva, C. R. D., Oliveira, M. B., Motta, E. S., Almeida, G. S. D., Varanda, L. L., Pádula, M. D., Leitao, A.C., Caldeira-de-Araújo, A. (2010). Genotoxic and cytotoxic safety evaluation of papain (*Carica papaya* L.) using in vitro assays. *BioMed Res Int*.
- Swisher, R.D. (1969). Detergent Enzymes: Biodegradation and environmental acceptability. Research reports. *Biosci* 19; 1093-1094.

Winton, J.R. (1991). Recent advances in the detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in aquaculture. *Ann Rev Fish Dis* 1, 83–93.

Wolf-Dieter Müller-Jahncke, Christoph Friedrich, Ulrich Meyer: *Arzneimittelgeschichte*. 2., überarbeitete und vervollständigte Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2005, ISBN 978-3-8047-2113-5, S. 109.

## 10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt

### Konferenzbeiträge

#### Vorträge

Oberle, M., Buchholz, R., Christian, J., Mletzko, A., Becker, A., Wedekind, H. (2019). Untersuchungen zur Beschaffenheit von bayerischen Teichböden: Konsequenzen für die Desinfektion. Vortrag, 29. Bayerischer Tierärztetag: Tierärztliche Betreuung von Aquakulturanlagen, 01.06.2019, Nürnberg

Becker, A.M., Oberle, M., Christian, J., Bergmann, S.M. (2018). Proteasen als alternative Desinfektionsmittel gegen Fischviren? XVII Tagung der Deutschsprachigen Sektionen der EAAP 3. - 5. Oktober 2018 Fribourg, Schweiz.

#### Poster

Becker, A.M., Zahner-Rimmel, P., Amtmann, A., Oberle, M., Bergmann, S. M., Christian, J. (2017). Investigation of protease use against fish viruses in aquaculture. 18<sup>th</sup> International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Belfast UK, 4-8 September 2017

Jin, Y.-H., Klafack, S., Becker, A.M., Klemenz, P., Amtmann, A., Christian, J., Oberle, M., Bergmann, S.M. (2017). Enzyme reaction for combat against fish viruses. 18<sup>th</sup> International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Belfast UK, 4-8 September 2017

Jin, Y.-H., Klafack, S., Becker, A.M., Klemenz, P., Amtmann, A., Christian, J., Oberle, M., Bergmann, S.M. (2018). Reaction of protease against koi herpesvirus. XVII Tagung der Deutschsprachigen Sektionen der EAAP 3-5 Oktober 2018 Fribourg, Schweiz.

Becker, A.M., Oberle, M., Bergmann, S.M., Christian, J. (2018). Investigation of proteases for disinfection of fish viruses. Himmelfahrtstagung 2018 - Heterogeneities - A key for understanding and upscaling of bioprocesses in up- and downstream 7-9 May 2018, Dorint Parkhotel Herrenkrug, Germany.

Becker, A.M., Oberle, M., Bergmann, S.M., Christian, J. (2019). Proteases as alternative disinfection agents against fish viruses? 19<sup>th</sup> International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 9-12 September 2019, Porto, Portugal.