

Viren und Plasmide in der Umwelt

Ausscheidung
Freisetzung
Biotechnologie

Herausgegeben von
J. M. Lopez Pila, E. Seeber und K. Jander



Gustav Fischer Verlag · Stuttgart/New York · 1988

Schriftenreihe des Vereins für
Wasser-, Boden- und Lufthygiene

78

Herausgegeben von **R. Leschber** und **E. Lahmann**

Der 1902 gegründete gemeinnützige Verein für Wasser-, Boden- und Lufthygiene E.V. fördert das gleichnamige Institut des Bundesgesundheitsamtes.

Außerdem tritt er über das Institut mit wissenschaftlichen Veranstaltungen auf den einschlägigen Gebieten der Umwelthygiene und der Gesundheitstechnik an die Öffentlichkeit.

Er gibt für seine Mitglieder die Schriftenreihe und die Literaturberichte über Wasser, Abwasser, Luft und feste Abfallstoffe (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York) heraus.

Geschäftsführender Vorstand:

Oberstadtdirektor a. D. Hans-Diether Imhoff, Dortmund

Direktor Dr.-Ing. Günther Annen, Essen

Direktor Dr.-Ing. Heinz Tessendorff, Berlin

Geschäftsführung:

Dipl.-Ing. Heiner Nobis-Wicherding, Postfach, 1000 Berlin 33

Alle Rechte der Übersetzung vorbehalten

© Copyright 1988 by Verein für Wasser-, Boden- und Lufthygiene,
Berlin-Dahlem

Printed in Germany

ISBN 3-437-30589-1

Herstellung: Westkreuz-Druckerei Berlin/Bonn, 1000 Berlin 49

Viren und Plasmide in der Umwelt

Ausscheidung
Freisetzung
Biotechnologie

Herausgegeben von
J. M. Lopez Pila, E. Seeber und K. Jander



Inhaltsverzeichnis

	Seite
E. Lahmann Vorwort	3
E. Seeber Sicherheitsfragen bei der Freisetzung von Viren und Plasmiden	5
H.I. Shuval The Transmission of Virus Disease by the Marine Environment	7
Diskussion I	25
B. Fattal, A. Dotan, Y. Tchorsh, L. Parpari and H.I. Shuval Penetration of <i>E. coli</i> and F2 Bacteriophage into Fish Tissues	27
J. Wekerle Viren in Flüssig- und Festmist sowie im Abwasser von Schlachtanlagen	39
Diskussion II	57
J.M. Lopez Pila, B. Warnecke Elimination von Viren im Rahmen der Abwasser- klärung, bei der weitergehenden Abwasserreinigung und in naturnahen Kläranlagen	59
T. Hahn, M. Karst, D. Tougianidou, K. Herbold, B. Flehmig und K. Botzenhart Verfahren zum Nachweis von Enteroviren und Coli- phagen in Wasser unterschiedlicher Herkunft	69
S. Guyer und R. Walter Untersuchungen zur Virusbelastung von Fließgewässern (Aare) in der Schweiz	85
H. Dizer Adsorptions- und Transportverhalten von Viren bei Sandfiltration	89
F. Traub, S.K. Spillmann, M. Schwyzer und R. Wyler Inaktivierung von Viren bei der Klärschlammbehandlung	107
H. Mahnel Inaktivierung von Viren in Wasser und Desinfektion	121
Diskussion III	137

Allgemeine Diskussion des ersten Tages: Viren im Wassertkreislauf	139
D.-E. Lesemann und R. König Pflanzenpathogene Viren im Oberflächengewässern	147
J. Huber Einsatz von insektenpathogenen Viren im Pflanzenschutz	153
R.D. Possee, I.R. Cameron, C.J. Allen and D.H.L. Bishop Experiences with the First Field Release of Genetically Engineered Viruses	165
W. Doerfler Das <u>Autographa californica</u> -Kernpolyedervirus als eukaryantisches Vektorsystem	187
Diskussion IV	193
A.H. Linton Plasmids in the Environment	197
W. Reineke Selektion und Verwendung von Mikroorganismen für die Metabolisierung von Umweltchemikalien am Beispiel der chlorierten Aromaten	225
K.N. Timmis, F. Rojo, J.L. Ramos, M.L. Krumme, and D.F. Dwyer Laboratory Engineering of Bacteria Designed to Degrade Pollutants	251
D. F. Dwyer, S.W. Hooper, F. Rojo, and K.N. Timmis Fate of Genetically-Engineered Bacteria in Activated Sludge Microcosms	267
Diskussion V	277
G. Mahro Regelungen zur Freisetzung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen und Viren in den USA	279
G. Schubert Stand der Beratungen über Regelungen zur Freisetzung genetisch veränderter Mikroorganismen und Viren in der Bundesrepublik Deutschland und auf EG-Ebene	295
E. Seeber Freisetzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen aus umwelthygienischer Sicht	305
Allgemeine Diskussion des zweiten Tages: Umwelthygienische und rechtliche Aspekte der Frei- setzung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen und Viren	307

Vorwort

E. Lahmann

Dieser Band steht unter dem Zeichen sowohl der klassischen Aufgaben der Umwelt- und Seuchenhygiene, die letztlich zur Jahrhundertwende zur Gründung unseres Institutes geführt hatten, als auch der potentiellen Gefahren, die von einem neuen, wichtigen und förderungswürdigen Wissenschaftszweig und dessen möglichen Anwendungen ausgehen. Das Thema der pathogenen Viren in der Umwelt zählt zu den klassischen Gebieten der Seuchenhygiene. Die Anwendungsaspekte der Gentechnologie hingegen, insbesondere die Freisetzung von genetisch veränderten Mikroorganismen und Viren, stellen die Umwelthygiene vor neuartige Aufgaben.

Genetisch veränderte Viren oder Plasmide sind wichtige Instrumente bei der Entwicklung von neuen Impfzügen, Medikamenten und anderen wichtigen Produkten.

Die Anwendungsmöglichkeiten der Gentechnologie sind jedoch mit Fragen nach möglichen Folgen dieser Technologie für die Gesundheit des Menschen und für die Umwelt verbunden. Vor einer möglichen Freisetzung von Organismen müssen Informationen über deren Persistenz, Pathogenität, Infektiosität und Ausbreitungsmöglichkeit vorliegen.

In dem vorliegenden Band werden einige Anwendungsmöglichkeiten genetisch veränderter Mikroorganismen und Viren dargelegt, und es werden Risikoaspekte angesprochen.

Den Autoren im In- und Ausland danke ich für ihre Beiträge, die ihren grossen Sachverstand und Erfahrung widerspiegeln.

Dem Verein für Wasser-, Boden- und Lufthygiene E.V. gilt ebenfalls mein Dank für die Förderung des Kolloquiums, das diesem Band zugrunde liegt.

Schließlich danke ich Frau M. Reppold für die Gestaltung des Bandes und das Schreiben der Texte sowie den Mitarbeitern des Fachgebietes Virologie, insbesondere Frau G. Hachula und Herrn R. Uhse-Nolte, für die redaktionelle Mithilfe.

Sicherheitsfragen bei der Freisetzung von Viren und Plasmiden

E. Seeber

Das zweitägige Virussymposium hat sich zum Ziele gesetzt, zunächst eine Bestandsaufnahme über natürlich vorkommende humanpathogene Viren und Plasmide in der Umwelt vorzustellen, um am zweiten Tag eine Standortbestimmung der Situation auf dem Gebiet der Biotechnologie bzw. Gentechnologie an Hand bereits entwickelter Prototypen vorzunehmen, die für die Umwelthygiene neue Fragen aufwerfen. Die Gentechnologie als die modernste Variante der Biotechnologie ist dabei zunehmend im Begriff, das Stadium der Grundlagenforschung und Laborversuche zu verlassen, um auf Nutzanwendung im Freiland zu drängen, wie dies verschiedene Freisetzungsexperimente inzwischen im Ausland zeigen. Besonders kritisch werden daher in der Öffentlichkeit Fragen einer Risikoabschätzung genetisch veränderter Mikroorganismen (Genetically Engineered Microorganisms = GEM) im Falle einer Freisetzung geführt. Dieser unterschiedliche und z.T. sehr heftig ausgetragene Meinungsstreit setzt sich auch in den verschiedenen Expertengruppen der berührten Disziplinen fort, wobei die Argumente der Nutzanwender mit den Vorbehalten der Umwelthygieniker bisher nicht ohne weiteres in Einklang zu bringen sind.

Als besonderes Dilemma ist in dieser Debatte der Mangel an geeigneten Prüf- und Bewertungskriterien sowie das Fehlen genügend spezifischer mikrobiologischer Nachweisverfahren - insbesondere im Niedrigdosisbereich - in der Umwelt anzusehen, Voraussetzungen also, die für eine angemessene Risikoausage bzw. Umweltverträglichkeitsprüfung unverzichtbar sind.

Der Ländervollzug, der für eine effektive behördliche Überwachung dieser neuen Technologien verantwortlich ist, befindet sich daher z.Z. in der schwierigen Lage, möglicherweise nachteilige Auswirkungen neuer Anwendungstechnologien in der Umwelt kontrollieren zu müssen, für die es bislang weder ausreichende Kenntnisse noch Methoden gibt.

Andererseits ist auf diesem Gebiet besondere Eile geboten, da schon in nächster Zeit mit Anträgen auf Freisetzung auch in der Bundesrepublik Deutschland

zu rechnen ist. Aus demselben Grunde beabsichtigt die EG-Kommission baldmöglichst eine Richtlinienentwurf zur Freisetzung dem Rat vorzulegen (EG XI / 123 / 87 - EN vom 25.05.1987)*, wobei auch hier - wie übrigens weltweit - z.Z. keinerlei Angaben zu verlässlichen und umweltbezogenen Prüfkriterien gemacht werden können. Hier herrscht noch ein erheblicher Handlungsbedarf.

Das Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes will daher diese Tagung zum Anlaß nehmen, auf das Spektrum bestehender Handlungsdefizite hinzuweisen, ohne deren Lösung ein fallbezogenes und effektives Begleitmonitoring zur Gewährleistung künftiger Umweltsicherheit nicht realisierbar ist. Es gehört zu den Aufgaben dieses Institutes, in allen Angelegenheiten der Umwelthygiene die Bundesregierung fachlich zu beraten. Daher ist es auch unsere Aufgabe, auf künftige, aber bereits voraussehbare Entwicklungen von besonderer Tragweite hinzuweisen und nach Möglichkeit in einem Stadium vorwegzudenken, in welchem Handeln noch möglich ist. An genau dieser Stelle befinden wir uns auch im Falle der Diskussion um die Freisetzungsbefragung, daß nämlich neben den Aspekten einer Nutzanwendung gleichzeitig auch konkrete Prüfanforderungen in den noch zu erststellenden Bewertungskatalogen zum Schutz der Umwelt mit aufgenommen werden. Hierauf soll am Ende des Symposiums noch näher eingegangen werden. Ein solches Vorgehen entspricht insbesondere auch den Leitlinien der Bundesrepublik zur Umweltvorsorge vom Herbst 1986 (Umweltbrief des BMU Nr. 33 vom 17. Dez. 1986, ISNN 0343 - 1312).

Den Referenten dieses Symposiums sei daher schon im voraus gedankt, daß sie zu uns gekommen sind, um uns mit ihren wissenschaftlichen Beiträgen bei dieser Standortbestimmung behilflich zu sein. Auch die übrigen Teilnehmer aus Wissenschaft, Öffentlichem Gesundheitsdienst (ÖGD) und Industrie werden hiermit gebeten, sich an der Sachdiskussion kritisch zu beteiligen.

*) Überarbeiteter Letztstand der EG-Richtlinie EG XI/A/2 vom 22.03.1988

The Transmission of Virus Disease by the Marine Environment

H. I. Shuval

SUMMARY

Human enteric viruses in urban wastewater often flow into the marine environment through outfall sewers which can cause pollution of adjacent beaches used for bathing and of areas where fish and seafood grow and are harvested for human consumption.

This paper will deal with the survival and dispersion of human enteric viruses in the marine environment and the risks to human health resulting from direct contact recreational activities such as bathing and/or the consumption of seafood, particularly mollusks which can concentrate viruses in the seawater and infect humans who eat such sea products raw or only partially cooked.

INTRODUCTION

This paper shall review the role of the marine environment in the transmission of infectious virus diseases resulting from the disposal of wastewater into the sea and/or virus contamination released directly from the bodies of bathers in densely populated recreational coastal areas. Mosley (1974) has called such diseases "thalassogenic" or human infections whose source is the sea (Greek: Thalass = the sea + genesis = source).

* This paper is based in part on "Thalassogenic Diseases" by H.I. Shuval - UNEP Regional Seas Reports and Studies No. 79 (1986) with the kind permission of the United Nations Environment Program.

OUTBREAKS ASSOCIATED WITH BATHING IN CONTAMINATED WATER

Typhoid Fever

Apparently, the earliest recorded outbreak of a thalassogenic infection associated with microbial contamination of bathing water was published by Pfuhl, in 1888. He reported on an outbreak of 49 cases of typhoid fever associated with swimming in the sewage polluted Elbe River in Germany. Reece (1909) described an outbreak of typhoid fever at a Royal Marine Camp at Walmer on the coast of Kent in southeast England. The outbreak was traced to swimming in a enclosed heated swimming pool which was filled periodically with seawater on a rising tide through an inflow pipe. The pool was subject to gross pollution with sewage carried by sea currents from two adjacent sewer outfalls, one of which received the untreated sewage of a communicable disease isolation hospital.

An outbreak of typhoid fever at a boys' camp near New Haven, Connecticut in the U.S.A. was traced by Campolini, in 1921, to bathing in sewage polluted seawater.

In 1929, Winslow and Moxon reported on suspected transmission of typhoid among those who bathed in the polluted waters of New Haven Harbor. A similar report on suspected typhoid transmission by bathing in polluted areas of New York Harbor was published in 1932 (N.Y. City Dept. of Health).

A Typhoid fever outbreak involving 10 cases in western Australia associated with bathing in a wastewater polluted coastal area near a broken outfall sewer was reported by Snow (1959). A number of persons in Alabama, U.S.A. became sick with typhoid fever as a result of swimming in a heavily sewage contaminated drainage ditch with a faecal coliform concentration of 10/100 ml (C.D.C., 1972). In Louisiana, a typhoid fever outbreak at Covington State Park was associated with swimming in heavily polluted river water, down-stream from the flow of a broken sewer line (C.D.C., 1963). Cabelli (1983) reported that four cases of typhoid fever detected in Alexandria, Egypt were all associated with swimming at a heavily polluted beach immediately impacted with raw sewage. The District Medical Officer of Health in Tel Aviv, Israel, attributed a number of cases of typhoid fever among children to the contact of faecal material on a heavily contaminated stretch of beach adjacent to a raw wastewater outfall sewer (Shuval, 1972). The beach itself was posted as an area where bathing was prohibited.

Virus disease

Concerning the transmission of virus disease by bathing in polluted water the evidence is mixed. The possible transmission of poliomyelitis by bathing in wastewater contaminated water was investigated intensively when that dis-

ease was still a major problem in the United States. Mosley (1974) states that the few published studies alleging such a relationship have been inconclusive. Moore (1959) in the U.K., did not find evidence of higher rates of poliomyelitis among bathers in polluted water than among non-bather controls.

A number of reports have dealt with the isolation of specific enteroviruses from different types of recreational waters in association with human infections. The earliest report involves an outbreak of disease of Coxsackievirus B1 etiology, an agent which had been undetected in the study area for the previous 14 years (McLean et al., 1964). This virus was concomitantly recovered from a city wading pool. A similar situation was described in Berlin in which virologic surveillance of the city swimming pool during one summer resulted in the recovery of Coxsackievirus B3 from 20 percent of the water samples. This virus was also the predominant agent recovered from clinical specimens obtained from children primarily manifesting meningitis or encephalitis (Liebscher, 1969). A report dealing with swimming pools indicated that Coxsackievirus B1 was recovered from the children's section of two Moscow swimming pools during a period of two months with concomitantly proven human infections with this agent during the same period (Osherovich and Chasovnikova, 1969).

A small outbreak of Coxsackievirus A16 illness in five children occurred some days after they had been bathing in a lake (Dnis et al., 1974). Coxsackievirus A16 was isolated from a 10-liter sample of lake water and from rectal swabs of two patients. A somewhat larger outbreak with accompanying isolation of the etiologic agent from a lake was reported by Hawley et al., in 1973. This outbreak involved 21 identified cases of acute viral illnesses in children at a summer camp located on the shores of Lake Champlain. Coxsackievirus B5 was isolated from 62 per cent of the clinical cases and 17 per cent of sampled asymptomatic individuals. The same virus was also recovered from the water of the beach along the lakeshore which the camp used for its swimming activity. However, epidemiologic analysis of the outbreak, fairly conclusively indicated that the principal mode of transmission was person-to-person, in that all but four cases were clustered in one cabin.

The lack of evidence of waterborne transmission in the Lake Champlain outbreak is similar to the findings of a summer camp study where virologic surveillance of the campers and environment was considerably more systematic (Paffenbarger et al., 1959). Over the course of the summer, 37 out of 681 participating campers had virus isolates. None of the environmental samples, including those taken from the camp swimming pool on a weekly basis, resulted in the isolation of a virus. As in the Lake Champlain study, virus spread was shown to be primarily or solely by direct transmission, in that specific viruses tended to concentrate in groups of boys living in the same cabins. There was no apparent transmission of illnesses by swimming or by any other environmental exposures.

It is clear that recreational waters not receiving sewage effluent can be contaminated with enteroviruses and that the serotype found in the water is likely to be the same one predominating in concomitant human infections. Thus, bathing waters so contaminated, by the bathers themselves, may at times serve as an effective route of transmission of some viral diseases. As an illustration of the inadequacies of many such investigations, Mosley (1974) points to the investigation of the epidemic of Coxsackie B5 virus at a boys summer camp, previously mentioned, which was reported to have been associated with swimming in a contaminated bathing area (Hawley et al., 1973). While the virus was detected in one of two water samples from the bathing area, the samples were taken after the epidemic was in progress and may have been excreted by the cases themselves. No bacteriological samples were taken. No investigations were made as to possible routes of sewage contamination of the bathing area. Mosley concludes that "such incomplete investigations are of little help".

As mentioned above, Denis et al., (1974) reported on an outbreak of Coxsackie A16 infection presumably associated with bathing in contaminated lake water and Bryan et al., (1974) also suggested that the evidence indicated that an outbreak of Hepatitis A was associated with swimming in a polluted lake. Cabelli, 1983 states that the evidence for the above two outbreaks as well as the Coxsackies B5 outbreaks mentioned above (Hawley et al., 1973) is questionable.

The largest reported bathing associated outbreak occurred, in 1979, when during a three day period, in July, 187 individuals developed gastroenteritis within three days of swimming at two lakes within a park in Michigan (C.D.C., 1979). Although the etiological agent was not at first identified, the short incubation period and the relatively mild gastroenteritis with short duration was suggestive of the human rotavirus, Norwalk agent and/or parvovirus. The CDC (1983) has recently reported on two additional outbreaks of swimming associated disease, definitely caused by Norwalk agent in Minnesota Parks. Cabelli (1983) feels strongly that the findings of his own studies support this finding.

D'Alessio et al. (1980) carried out a study of virus transmission in swimming waters at beaches, at fresh water lakes and swimming pools in Madison, Wisconsin. The retrospective study consisted of a surveillance of recent swimming activities and clinical histories of 3,774 children who visited a pediatric clinic. Children, with clinically apparent acute viral infections, were tested for virus infection in the laboratory. The unique feature of this study was that its aim was supposedly to test the hypothesis that recreational waters not exposed to contamination by sewage effluent can serve as a medium for transmission of virus diseases, particularly enteroviruses. According to the report, no sewage effluent is discharged into the lake in the vicinity of the bathing areas.

The researchers' conclusions are as follows:

1. That children who visited swimming sites consistently reported more illness of apparent viral etiology, both respiratory and gastrointestinal, than those who refrained from those activities, i.e. a statistically significant association between swimming activities and enteroviral illness was demonstrated.
2. There was no apparent association between the frequency of visits to swimming sites and illness.
3. The data suggests that water served as the enterovirus transmission medium, although this study does not provide direct evidence on this point.
4. The results suggest, although less strongly, that the risk of acquiring enteroviral illness may be greater at beaches, than at swimming pools.

It must be noted that at these so called pollution free beaches, the mean faecal coliform counts for 1976 were 24/100 ml, and for 1977 39/100 ml with numerous counts over 1000. There were even a few individual enterococci and E. coli counts over 10,000/100 ml. The report states that "the origin of the faecal coliforms and enterococci, which repeatedly has lead to the closing of the individual beaches for short periods, is not clear despite considerable investigation". Suspicion that some of the bathing waters were indeed exposed to external sources of sewage pollution does make it difficult to accept the authors' assumption that the only source of viruses was from the bathers bodies. The possibility of microbial contamination from birds which can excrete faecal coli was not investigated by the authors. Considering these serious limitations in the study design, it is difficult to evaluate the findings of this study.

The researchers hypothesize that since the enteroviruses that caused the excess infection among swimmers were not introduced into the water by external sources of sewage flows, viruses excreted by the bathers themselves from the respiratory tract or intestinal tract were the source of the contamination of the water. The authors also consider the possibility that the virus diseases were transmitted by person-to-person contact at the swimming site rather than through the medium of the bathing water.

This study suffers from two cardinal weaknesses both recognized by the researchers themselves. Firstly, the actual swimming activities of the subjects were not known. It was only known if the subjects "visited" the bathing sites. Secondly, the microbiological quality of the water was not monitored by the researchers but by the City of Madison on a weekly basis. The quality of the bathing waters as determined by tests for faecal coliforms and enterococci varied widely during the study period. The geometric mean for enterococci for all beaches during the study was 71/100 ml in 1976 and 108 in 1977, with numerous individual tests above 1000/100 ml. Thus, transmission of virus disease by bathing in sewage contaminated water or water contaminated directly by other bathers is a decided possibility.

Ear, eye, nose and respiratory disease

One of the first systematic attempts to collect information on communicable disease in relation to bathing was made in 1921 when a committee of the American Public Health Association (Simons et al., 1922), sent out 2,000 questionnaires to specialists in eye, ear, nose and throat disease and to health officers, asking for opinions and information on bathing as a factor in the transmission of disease. From 571 responses in which at least one question was answered, the committee concluded that certain outbreaks could reasonably be ascribed to swimming, including 7 outbreaks of conjunctivitis, 2 of middle ear infection, 2 of pharyngitis and tonsillitis and 1 of sinusitis.

It was apparently assumed from the above findings, that certain upper respiratory, ear and eye infections are caused by organisms from wastewater polluted bathing water. According to Mood and Moore (1976) no evidence for this conclusion can be found in the literature. They conclude that "In man, middle ear and sinus infections are usually caused by organisms from the patients nasopharynx, which may be mechanically introduced into the paranasal cavities in the course of swimming and diving".

In 1955, Bell et al., published the first epidemiological study of pharyngoconjunctival fever, a then recently recognized disease entity caused by what are now known as adenoviruses. This was a highly infectious disease characterized by high fever, pharyngitis and conjunctivitis. Spread was most rapid from person-to-person in effected households, but the pattern of spread in camps suggested that contaminated swimming pool water might have been "a possible source of infection accessory to a person-to-person mode of spread". Later work has shown that the conjunctival route is a very efficient one for the transmission of adenovirus infection. Swimming-pool outbreaks have also been described as occurring during periods of defective chlorination (Foy et al., 1986). Adenoviruses are readily destroyed by chlorine. A higher incidence of pharyngoconjunctival fever in bathers when chlorination was ineffective, suggestive of a graded dose response relationship, would therefore, support the view that bathing in body contaminated water caused the disease (Mood and Moore, 1976).

Mood and Moore (1976) are of the opinion that whatever the relative importance of person-to-person spread and swimming pool water transmission in this disease is, it is quite clear that pharyngoconjunctival fever is an upper respiratory tract infection, the incidence of which bears no logical relationship to sewage pollution of bathing water. However, it is a disease which may be transmitted by bathing, the route of the infectious agent being bather-water-bather.

The most convincing evidence of the health risks associated with bathing in wastewater contaminated seawater is derived from the US EPA prospecti-

ve epidemiological studies by Cabelli et al. (1983) and Defour et al. (1984). These researches found a strongly significant association between the enterococci concentration of wastewater origin of marine bathing waters and highly credible gastrointestinal diseases, particularly among children. Cabelli has hypothesized that the most probable etiological agents are rotavirus or Norwalk virus because of their high concentrations in wastewater, their long survival in the marine environment and their very small minimal infective dose.

OUTBREAKS ASSOCIATED WITH CONSUMPTION OF SHELLFISH

In the case of direct human exposure to pathogens in seawater during bathing, limited ingestion, dilution and die-away of the pathogens are major protective mechanisms. This is much less the case as far as edible bivalves, such as oysters, clams, mussels, and cockles are concerned. They, as filter feeders, pump large volumes of seawater through their systems and filter out, concentrate and protect the microplankton, together with attached or suspended particles including the pathogens in the sea. These types of shellfish are usually consumed raw or partially cooked.

Typhoid fever

According to Mosely (1974), although one epidemic of oyster-associated typhoid fever was reported from France as early as 1816, it was not until the 1890's and early 1900's that the importance of this mechanism was recognized. The large proportion of cases in some parts of Britain at that time was found to be due to consumption of contaminated oysters, mussels, and cockles. Epidemics of shellfish-associated typhoid were also described at the turn of the century in the United States (Sooper, 1905 and Stiles, 1912) although they do not appear to have been so numerous or extensive as in Britain because shellfish were less widely consumed. The recognition of shellfish as a vehicle for enteric agents resulted in some modifications of sewage disposal, with lessening of marine pollution, and there was an inception of shellfish sanitation as a public health activity.

It is questionable whether the contention that the reduction in typhoid fever rates in Brighton, between 1885 and 1907, was exclusively brought about by improved sanitary conditions in the shellfish growing areas is fully justified, since typhoid fever was also on the decline in many inland cities as a result of improved water supplies and generally improved hygienic conditions. In the 1920's, a number of major typhoid fever epidemics were traced to contaminated shellfish in the United States. Brooks (1916), reported on an outbreak of typhoid attributed to infected oysters. Lundsen et al., (1924) described a typhoid fever epidemic in 1924 caused by oyster-borne infection. There also was a major typhoid epidemic in Chicago in 1925 apparently due to oysters (Bundersen, 1925).

The mode of transmission of typhoid fever by bivalves growing in sewage contaminated water was well established during the early years of this century and served as the basis for the establishment of shellfish sanitation programs in the U.K. and in the United States based on approved, clean harvesting areas and programs of shellfish self-purification in clean-water holding tanks called "depuration" by the Americans. The disappearance of epidemics of typhoid fever transmitted by shellfish may partially be a result of the success of the programs, but may also be explained by the general reduction in typhoid fever during the period 1920 to 1940 as a result of improvements in water treatment, general hygiene and sanitation, surveillance of food handlers and supervision of known typhoid carriers (Mosley, 1974).

The fact that since then, numerous major outbreaks of infectious hepatitis type A (IHA) were clearly identified as being transmitted by mollusks grown in wastewater contaminated beds indicates that the simple sanitary improvements of the early years of the century did not completely block this route of transmission of thalassogenic disease.

Infectious hepatitis and other virus diseases

Mosley (1974) has reviewed the epidemiological aspects of transmission of infectious hepatitis (IHA) and other virus diseases by shellfish, the main findings of which are presented below.

The Swedish oyster-associated IHA epidemic of 1955-56 (Ross, 1956) was regarded in the United States as an epidemiologic curiosity until 1962. In that year, an oyster-associated IHA outbreak in the southern United States in Mississippi and Alabama involving 84 cases (Mason and Lean, 1962) and a clam-associated epidemic centered in New Jersey involving 459 cases (Doughtery and Altman, 1962) made it evident that the absence of shellfish-associated typhoid fever was not synonymous with absence of contamination by sewage. Two additional clam-associated epidemics, involving hundreds of cases followed in 1964 (Ruddy, et al., 1969; Hepatitis Surveillance Unit, 1964), and an outbreak of major proportion was reported in 1973 (C.D.C., 1973). In addition, there is an "endemic" background or sporadic cases that may total as many as several hundreds each year.

Outside the United States, there has been little interest in mollusk-associated type A hepatitis. Since the Swedish report in 1965, only one investigation has been reported in the literature. Stille and co-workers (1972) indicated that consumption of contaminated mollusks accounted for an estimated 19 per cent of type A hepatitis in Frankfurt. The German cases were mainly attributable to eating oysters and mussels on the Mediterranean littoral, especially southern France and Italy.

The occurrence of shellfish-associated hepatitis is not confined to mollusks eaten raw, because steaming as usually practiced fails to raise the internal temperature sufficiently to inactivate the viral agent (Koff and Sears, 1967).

A recent question is that of the possible transmission of type B (IHB) hepatitis by accumulation of hepatitis B virus (IHB) in oysters and clams (Mahony et al., 1974). The only demonstration of mollusk contamination, however, was in samples taken from a bed adjacent to a hospital's sewage outfall. Many other samples along the coast were negative for IHB. Mosley feels that seafood is not a significant route of transmission of type B hepatitis (IHB), since occurrence of the agent in faeces is doubtful, and oral infection of serum is low. Mosley (1974) argues that disposal, by pouring down a sink, of one or several units of IHB contaminated blood at a hospital, however, could conceivably result in an occasional infection. However, Mosley neglects to mention that blood from menstruation normally reaches the sewage systems, providing a continuous source of contaminated IHB virus.

Metcalf and Stiles (1967) demonstrated enteroviruses in oysters harvested from contaminated waters closed to harvesting and Denis (1973) reported recovery of Coxsackie A viruses in a significant percentage of market samples of shellfish taken in France.

The designation "shellfish" includes not only mollusks but also crustaceans. Mollusks are frequently eaten raw and the entire animal is consumed including the gastrointestinal tract. This fact, in addition to their ability to concentrate particulate matter, is very relevant to their frequent implication as vehicles of enteric infection. Crustaceans, on the other hand, are commonly eaten after removal of the gastrointestinal tract and other viscera, and cooked to a degree that would seem adequate to kill any organisms that might be present. Crustaceans also do not have the same efficiency of concentrating small organic particles from seawater as do mollusks. However, DiGirolamo and co-workers (1972a) have demonstrated that West Coast, United States, shore crabs accumulated polio-virus both in artificially contaminated seawater and when allowed to feed on virus-contaminated mussels. In another experiment, they demonstrated phage uptake into the edible flesh of the crab and its persistence after cooking in boiling water for as long as 20 minutes.

A later review of transmission of virus disease by shellfish was published by Goldfield (1976) in which he lists 13 published reports of common source outbreaks of hepatitis A, associated with shellfish ingestion (see Table 2). He concludes that the 1,612 cases of shellfish-associated IHA recognized in the 13 outbreaks represent but a small proportion of those that actually occurred. Knoff et al., (1967) have provided evidence suggesting that ingestion of raw clams and oysters may also account for a small but significant fraction of sporadic cases of IHA during non-epidemic periods. Mosley (1974) shares this view.

Goldfield (1976) also reports on five outbreaks of gastroenteritis of unknown etiology in which shellfish including clams and oysters were implicated. He suggested that some of these outbreaks of "non bacterial" etiology may have been caused by parvoviruses. The first clear-cut shellfish-associated epidemic caused by the Norwalk-like virus was a massive gastroenteritis outbreak in all areas

of Australia in which some 2,999 cases were reported. This outbreak was associated with the consumption of raw shellfish harvested from wastewater contaminated areas (Murphy et al., 1979). One estimate suggests that possibly 10 to 20 times that number of people were actually infected in the outbreak.

There is now ample evidence that shellfish, particularly mollusks grown in sewage polluted water are very effective carriers (and concentrators) of IHA virus and Norwalk virus, and have on numerous occasions caused infection in humans.

In addition to clear epidemics of virus disease associated with consumption of raw or partially cooked shellfish there is growing evidence that shellfish consumption is strongly associated with the endemic transmission of infectious hepatitis.

In a case controlled study, it was reported that 25% of the hepatitis A cases in southeast England could be attributed to the consumption of shellfish (O'Mahany et al., 1983). Stille et al. (1972) in Germany reported that consumption of contaminated mollusks accounted for an estimated 19% of the infectious hepatitis in Frankfurt, Germany. In the United States, Koff et al. (1967) conducted a prospective study to determine the modes of transmission of nonepidemic infectious hepatitis cases among 10 Boston hospitals. Ingestion of raw shellfish was found to be significantly more frequent (34/185) in infectious hepatitis patients than controls (10/185). Ingestion of steamed clams (13/104) was more common in patients than matched controls; only 3 of the 13 patients had been exposed to jaundiced persons. When considered together, ingestion of steamed clams or raw shellfish was as frequent a potential exposure to hepatitis as was contact with jaundiced persons.

Reports have implicated shellfish as a source of non-A, non-B hepatitis (Alter et al., 1982). In a study of patients in five Baltimore, Maryland, hospitals, Alter et al. (1982) found that raw shellfish ingestion was associated with 12.5% of the cases on non-A, non-B hepatitis. This was the third common risk factor after parental drug use and history of blood transfusions. It is possible that different non-A, non-B hepatitis viruses were associated with the shellfish than with parental drug use and blood transfusions.

In the United States, the first case of shellfish-associated gastroenteritis attributed to Norwalk virus, and documented as such, occurred in 1980 after individuals consumed oysters from Florida (Gunn et al., 1982). In 1980 in New York State there were 103 well-documented outbreaks in which over 1,000 persons became ill with diarrhea from eating clams and oysters. Norwalk virus was identified in both clam and oyster specimens as well as serologically in five of seven of the outbreaks. Importation of depurated English clams led to yet another round of enteric virus illness (Richards, 1985).

A group of small round viruses have been reported as the cause of numerous outbreaks of shellfish associated gastroenteritis (Appleton and Pereira, 1977; Gill et al., 1983). These viruses do not appear to be serologically re-

lated to the Norwalk virus. More recently the Snow Mountain virus has been reported as the cause of several clam associated outbreaks of gastroenteritis (Dolin, 1987).

SURVIVAL OF ENTERIC VIRUSES IN THE MARINE ENVIRONMENT

Numerous studies have been conducted on the survival of viruses in marine waters. Enteric viruses have been reported to survive from 2-130 days in seawater in laboratory studies and generally survive longer in such environments than coliform bacteria (Melnick and Gerba, 1980). However, Goyal et al (1984) was able to isolate enteroviruses from sediment and blue crabs at the Philadelphia dump site 18 months after sludge disposal had stopped. A number of variables have been found to affect virus survival. These include temperature, salinity, microbial, antagonism, solar radiation, and association of viruses with solids (Kapuscinski and Mitchell, 1981). Of the many factors which can influence virus survival, temperature is the most important. At temperatures below 10°C enteric viruses could be expected to survive for several months (Gerba and Goyal, 1986). Marine sediments also act to protect viruses against inactivation, perhaps by reducing the rate of thermoninactivation (Liew and Gerba, 1980). Generally when sediment is present, inactivation rates of viruses in seawater-moistened sand tended to be 4.5 fold slower than in seawater alone (Gerba and Goyal, 1986). This probably explains why Goyal et al. (1984) was able to detect enteric viruses in marine sediments at the Philadelphia sludge dumpsite in the sediments 18 months after disposal had stopped.

CONCLUSIONS

Enteric viruses can enter the marine environment in massive quantities and serve as a major source of human infections as a result of disposal of urban wastewater into coastal water in the vicinity of bathing beaches and seafood growing and harvesting areas. Viruses can survive for weeks or even months in the marine environment, particularly in sludges and sediments. There is now ample epidemiological evidence that bathing in wastewater contaminated seawater can cause acute enteric disease most likely of virus etiology particularly among young children with low levels of immunity. In addition, enteric or respiratory viruses shed directly from the bodies of bathers into recreational waters with high bather density can be a cause of human infections.

There is very strong evidence that shellfish which effectively concentrate pathogens from polluted marine waters serve as a major mode of transmission of infectious hepatitis and diseases associated with other enteric viruses such as Norwalk virus.

Reducing wastewater contamination of the marine environment in areas adjacent to recreational beaches or shellfish harvesting beds is the most effective method of reducing such health risks. There is also growing evidence that suggests that some virus disease is transmitted in bathing water as result of high bather density and poor dilution due to inadequate water exchange at semi-closed beaches. Controlling bather density and improving water exchange rates may be an important control measure that should be developed.

REFERENCES

1. Appleton, H., and Pereiera, M.S.: A possible virus etiology in outbreaks of food poisoning from cockles. *Lancet*, ii (1977), 780 - 781
2. Alter, M.J., Gerety, R.J., Smallwood, L.A., Sampliner, R.E., Tabor, E., Deinhardt, F., Flosner, G., and Matanossi, G.M.: Sporadic non-A, non-B hepatitis: Frequency and epidemiology in an urban U.S. population. *J. Infect. Dis.* 145 (1982), 886 - 893
3. Bell, J.A., Rowe, W.P., Engler, J.I., Parrott, R.H., and Huebner, R.J.: Pharyngoconjunctival fever: Epidemiological studies of a recently recognized disease entity. *J. Am. Assoc.* 157 (1985), 1083
4. Brooks, P.B.: Outbreak of typhoid attributed to infected oysters. *J. Am. Med. Ass.* 66 (1916), 1445
5. Bryan, J.A., Lehmann, J.D., Setiady, I.F., and Hatch, M.H.: An outbreak of hepatitis A associated with recreational lake water. *Amer. J. Epidemiol.* 99 (1974), 145
6. Bundesen, H.N.: Typhoid epidemic in Chicago apparently due to oysters. *J. Am. Med. Ass.* 84 (1925), 641
7. Cabelli, V.J.: Health effects criteria for marine recreational waters - R & D Report No. EPA-600/1-80-031. U.S. Environmental Protection Agency - Research Triangle Park, N.C. August 1983, pgs. 98
8. Cabelli, V.J., Du Four, A.P., McCabe, L.J., and Levin, M.A.: A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. *Jour. WPCF*, 55 (1984), 1306 - 1314
9. Campolini, E.: A study of typhoid fever incidence in the health center district of New Haven. Unpublished report (1921)

10. CDC - Center for Disease Control: Typhoid fever at Covington State Park. Louisiana. In: *Salmonella Surveillance* CDC No. 18 (Nov., 1963)
11. CDC - Center for Disease Control: Epidemiologic notes and reports. Typhoid fever-Alabama. *Morbidity and Mortality Weekly Reports*. USDHEW/PHS Vol. 21 No. 32 (August, 1972)
12. CDC - Center for Disease Control: Follow-up on shellfish-associated hepatitis. *Morbid. Mortal. Wkly. Rep.* 22 (1973), 388
13. CDC - Center for Disease Control: Gastroenteritis associated with lake swimming - Michigan Morbidity and Mortality Weekly Reports. USDHEW/PHS Vol. 28 No. 35 (1979), 413
14. D'Alessio, J., Mino, T.E., Nelson, D.B., Allen, C.I., and Tsiantis, A.A.: Epidemiological studies of virus transmission in swimming waters. E.P.A. Research Report EPA-60011-80-006, January, 1980 - United States Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio (1980), 61
15. Dolin, R., Treanor, J.J., and Meyer, F.M.: Novel agents of viral gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 155 (1987), 365 - 376
16. Denis, F.A.: Coxsackie group A in oysters and mussels. *Lancet*, i (1973), 262
17. Doughtery, W.J., and Altman, R.: Viral hepatitis in New Jersey. *Am. J. Med.* 32 (1962), 704
18. Foy, H.M., Cooney, M.K., and Hatlen J.B.: Adenovirus type epidemic associated with intermittent chlorination of a swimming pool. *Arch. Env. Health.* 17 (1968), 795
19. Gerba, C.P., and Goyal, S.M.: Development of a Qualitative Pathogen Risk Assessment Methodology for Ocean Disposal of Municipal Sludge. U.S. Environmental Protection Agency, ALAO-CIN-493, Cincinnati, OH
20. Goldfield, M.: Epidemiological indicators for transmission of viruses by water. In: *Viruses in Water*. Editors G. Berg, H. Bodily, E. Lennette, J. Melnick and T. Metcalf. American Public Health Assoc., Washington, D.C. (1976), 70 - 85
21. Goyal, S.M.: Viral pollution of the marine environment. *CR Crit. Rev. Environ. Contr.* 14 (1984), 32

22. Gunn, R.A., Janowski, H.T., Lieb, S., Prather, E.C., and Greenberg, H.B.: Norwalk virus gastroenteritis following raw oysters consumption. *Am. J. Epidemiol.* 115 (1982), 348 - 351
23. Hawley, H.B., Morin, D.P., Geraghty, M.E., Tomkow, J., and Philip, C.A.: Coxsackievirus B epidemic at a boys summer camp-Isolation. *J. Am. Med. Ass.* 226 (1973), 33 - 36
24. Hepatitis Surveillance Unit: Clam-associated epidemics of infectious hepatitis. Communicable disease center, Atlanta Hepatitis Surveillance Rep. 18 (1964), 14
25. Koff, R.S., and Sear, H.S.: Internal temperature of steamed clams. *New Engl. J. Med.* 276 (1967), 737
26. Liebscher, S.: Enteroviren im Schwimmbadwasser. *Z. Gesamt. Hyg.* 16 (1969), 198 - 200
27. Liew, P., and Gerba, C.P.: Thermostabilization of enteroviruses by estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 (1980), 305 - 308
28. Lundsen, L.L., Hasseltine, H.E., Leaky, J.P., and Velder, M.V.: Typhoid fever epidemic caused by oyster borne infection. *Publ. Hlth. Rep.*, Washington, Suppl. No. 50 (1924)
29. Mahoney, P., Fleischner, G., Blumber, B.S., Millman, I., London, W.T., and Arias, I.M.: Australia antigen: Detection and transmission in shellfish, *Science*, N.Y. 183 (1974), 80
30. Mason, J.O., and McLean, W.R.: Infectious hepatitis traced to the consumption of raw oysters. *Am. J. Hyg.* 75 (1962), 90
31. McLean, D.M., Larke, R.P.B., McNaughton, G.A., et al.: Enteroviral syndromes in Toronto, 1964, *Can. Med. Ass. J.* 92 (1965), 658 - 661
32. Melnick, J.L., and Gerba, C.P.: The ecology of enteroviruses in natural waters. *CRC Crit. Rev. Environ. Cont.*, 10 (1980), 65 - 93
33. Metcalf, T.B., and Stiles, W.C.: Viral pollution of shellfish in estuary waters. *Am. J. Epidemiol.* 88 (1967), 3
34. Mood, E.W., and Moore, B.: Health criteria for the quality of coastal bathing waters. Unpublished mimio draft document - Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, March 30, (1976), 39

35. Moore, B.: Sewage contamination of coastal bathing waters Bull. Hyg. London 29 (1959), 689
36. Mosley, J.W.: Epidemiological aspects of microbial standards for bathing beaches; In: Discharge of Sewage from Sea Outfalls. Proceedings of an International Symposium - London (1974) - Edit, A.L.H. Gamesson, Pergamon Press., Oxford (1974), 80 - 93
37. Murphy, A.M., Grohmann, G.S., Christopher, P.J., et al.: An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus. Med. J. Aust. 2 (1979), 329 - 333
38. New York City Dept. of Health: Typhoid fever from bathing in polluted waters. Weekly Bull. N.Y. City Dep. Hlth. 21 (1932), 257
39. O'Mahany, M.C., Gooch, C.D., Smyth, D.A., Thrussell, A.J., Bartlett, C.L.R., and Noah, N.D.: Epidemic hepatitis A from cockles. Lancet, i (1983), 518 - 520
40. Osherovich, A.M., and Chasovnikova, G.S.: Some results of a virologic investigation of environmental sources. Hyg. Sanit., 34 (1969), 424 - 427
41. Paffenbarger, R.S., Berg, G., Clarke, N.A., et al.: Viruses and illness in a boys summer camp. Amer. J. Hyg. 70 (1959), 254 - 274
42. Pfuhl, F.: Deutsche Med. Zeitschr. Vol. 17 (1888), 9 (as quoted in Co-liform Standards for Recreational Areas, Jour. San. Eng. Div. Proc. A.S.C.E. 89 (Aug. 1963), 57 - 94
43. Reece, R.J.: 38th Annual Report to Local Government Board, 1908-9 Suppl. with Rept. of Med. Office for 1908-9. Appendix A, No. 6 (1909), 90
44. Richards, G.P.: Outbreaks of shellfish-associated enteric virus illness in the United States: requisite for development of viral guidelines. J. Good Protect. 48 (1985), 815 - 823
45. Roos, B.: Hepatitis epidemic conveyed by oysters. Svenska Lakartidn. 53 (1956), 989
46. Ruddy, S.J., Johnson, R.F., Mosley, J.W., Atwater, J.B., Rosetti, M.A., and Hart, J.C.: An epidemic of clam-associated hepatitis. J. Am. Med. Ass. 208 (1969), 649

47. Shuval, H.I.: WHO document EP/WP72 (1972), 4
48. Simons, G.W., Jr., Hillscher, R., Ferguson, H.F., and Gage, S.de M.: Report of the committee on bathing places. Am. J. Public Health 12 (1922), 121
49. Snow, D.J.R.: Typhoid and city beach. Western Australia. Report of the Commissioner of Public Health for the year 1958, (1959), 52
50. Soper, G.A.: Typhoid fever at Lawrence, N.Y. due to oysters. Med. News 86 (1905), 241
51. Stiles, G.W.: Sewage-pollution as a cause of typhoid and GI disturbances. Chem. Bull 156 (1912), 16
52. Stille, W., Kunkel, B., and Nerger, K.: Austern-Hepatitis. Dt. Med. Zeitschr. 97 (1972), 145
53. Winslow, C.E.A., and Moxon, D.: Bacterial pollution of bathing beach waters in New Haven Harbor. Am. J. Hyg. 8 (1928), 299

Tab. 1: Common source outbreaks of hepatitis associated with shellfish ingestion (from Goldfield, 1976)

Year	Source	Place	No. of cases
1953	Oysters	Oregon	30
1955	Oysters	Sweden	629
1961	Oysters	Mississippi & Alabama	84
1961	Clams	New Jersey	459
1961	Clams	Connecticut	15
1962	Clams	New York	3
1963-4	Clams	New Jersey & Pennsylvania	252
1963-4	Clams	Connecticut	123
1964	Oysters	North Carolina	3
1964	Oysters	British Columbia	2
1966	Clams	Massachusetts	4
1967	Clams & Oysters	Texas	3
1971	Clams	Massachusetts	5

Diskussion I

Aus technischen Gründen konnte der Beitrag von Herrn Professor K.O. Habermehl: "Rolle von enteralen Viren als Krankheitserreger" nicht in den Band aufgenommen werden. Wir drucken trotzdem die sich anschließende Diskussion wegen der wichtigen angeschnittenen Thematik ab.

Lopez Pila: Herr Prof. Habermehl, Sie erwähnten in Ihrem Vortrag, daß durch vorhandene oder noch zu entwickelnde Therapeutika gegen Viren die virale RNA lange Zeit in der Zelle persistieren könnte und daß man u.U. zu befürchten hat, daß diese danach Schlimmeres oder Unerwünschtes in der Zelle anrichtet. Sind solche Fälle bekannt, sei es aus Tierversuchen, sei es aus anderen Studien?

Habermehl: Ich muß das etwas differenzieren: Für virale RNA, hier bei den Enteroviren geht es ja um die RNA-Viren, ist diese Wahrscheinlichkeit zunächst einmal geringer. Die Wahrscheinlichkeit, daß das persistierende Virus RNA im Genom der Zelle inkorporiert wird und dann über längere Zeit dort verbleibt, evtl. über Generationen mitvermehrt wird, ist gering. Bei den Retroviren, bei denen aus dem Virus RNA sozusagen rückwärts ein Virus-DNA gemacht wird, ist das ein generelles Phänomen. Da ist es so, daß in jedem Falle nach einer solchen Infektion Teile des Virusgenoms oder das ganze Genom in der Zelle inkorporiert oder stabil angelagert wird und nie wieder herausgeht. Bei der RNA aus Enteroviren wissen die Fachleute, daß so etwas auch der Fall sein könnte. Zwei Dinge: Wir haben, wenn wir einmal eine Enteroviren-Infektion gehabt haben, die Tatsache, daß wir extrem lange Antikörpertiter beobachten können, Antikörpertiter, die man eigentlich nur beobachtet, wenn man Antigenpersistenz hat. Also irgendeine Viruspersistenz in irgendeiner Weise muß vorhanden, aber bisher nur sehr bedingt nachweisbar gewesen sein. Der zweite Punkt: wenn man sehr genau hinschaut, vor allem mit genetischen Methoden, mit denen bestimmte Genbestandteile des Virus mit Hybridisierungstechniken nachweist, stellt man Spuren von Enteroviren fest, die irgendwann einmal ins ZNS gekommen sein müssen. Man hat versucht, die Amyotrophe Lateralsklerose ätiologisch darauf zu beziehen. Die Dinge sind da noch vollständig offen, aber wenn man genau genug sucht, wird möglicherweise persistentes Virusmaterial nachzuweisen sein. Das sind die natürlichen Bedingungen. Wenn wir die natürlichen Gleichgewichte verschieben schaffen wir einen Selektionsdruck, den wir auch haben würden, wenn wir bestimmte Therapeutika ansetzen. Dann könnte es theoretisch sein, daß unter diesen neuen Gleichgewichtsbedingungen, unter dem neuen Selektionsdruck, die Persistenz eine größere Rolle spielt als bisher.

Seeber: Wir können durch Beobachtungen in eigenen Forschungsvorhaben eine lange Überlebenszeit von Viren feststellen. Ein weiterer interessanter Aspekt: Es ist offensichtlich bei den Enteroviren nicht notwendig, daß sie in organisches Material eingebettet sind. In unserem Forschungsvorhaben "Transportverhalten und Verweildauer von Viren in Grundwasserleitern" haben wir in einem extrem substratarmen Medium, nämlich Wasser, ebenfalls erhebliche Überlebenszeiten - bis über 20 Monate - festgestellt. Dieses Forschungsvorhaben hatte damals den Zweck, die Notwendigkeit der Grundwasserschutzzonen zu untersuchen und auf Grund dieser Überlebenszeiten sind wir natürlich ganz strikt auf dem Konzept der sogenannten 50-Tage-Zone geblieben. Wir waren damals überrascht, denn wir gingen von wesentlich kürzeren Überlebenszeiten aus. Vielleicht könnte Prof. Habermehl ausführen, wie es zu dieser langen Persistenz von Viren kommt.

Habermehl: Wenn man das auf ganz einfache Inaktivierungsmodelle zurückführt, dann steht fest: Die Umweltbereiche, mit denen Sie sich überwiegend befassen, sind Milieus, in denen die Temperaturen im allgemeinen nicht sehr hoch sind, etwa um 12°C; es liegt also eine sehr günstige Situation für die Lagerung von Erregern vor. Zweitens ist es wichtig, daß möglichst wenige Enzyme vorhanden sind, die proteolytische Eigenschaften haben; das ist im allgemeinen hier der Fall. Viren sind auch relativ UV-empfindlich. Ein einziger UV-Treffer, die Veränderung eines einzigen Nukleotids durch einen UV-Treffer, genügt zur Inaktivierung, denn bei fast allen Enteroviren wird die gesamte genetische Information in einem Strang abgelesen und hinterher aufgeteilt. Wenn an einem Strang, an einer Stelle, ein Treffer ist, geht es nicht mehr weiter, das Virus ist dann inaktiv. Hier ist das gleiche unter Grundwasserbedingungen oder in Wasserleitungen. Sie haben also auch keine UV-Einwirkungen, da die Viren physikalisch recht gut geschützt sind. Der letzte Punkt ist ein quantitatives Problem: Wenn sie 10 infektiöse Partikel haben und eine Inaktivierungsrate von 10% pro Tag, dann ist nach 10 Tagen theoretisch das Problem erledigt. Wenn sie die gleiche Inaktivierungsrate bei 1×10^9 Partikeln haben, werden Sie eine viel längere Zeit brauchen.

Weber, Wien: Herr Prof. Shuval hat in seinem sehr interessanten Vortrag ausgeführt, daß nicht nur die Hepatitis A sondern auch die Hepatitis Non-A/Non-B-Viren zu wasserübertragenden Erkrankungen geführt haben, was inkludiert, daß hier also auch ein fäkal-oraler Infektionsmodus anzunehmen ist. Mir war bis jetzt nicht bekannt, daß das Non-A/Non-B-Virus auch einen fäkal-oralen Infektionsweg hat. Ich würde darum bitten, was hier auf diesem Gebiet über einen fäkal-oralen Infektionsmodus bekannt ist, auszuführen.

Shuval: Es gibt sehr wohl epidemiologische Evidenzen dafür, daß ein Teil der Non-A/Non-B Hepatitis-Viren - diese Gruppe ist taxonomisch keinesfalls definiert - in der Tat oral-fäkal übertragen wird. Speziell die große Epidemie in Indien 1955, bei der über 25.000 Erkrankungen stattfanden und die ganz eindeutig durch eine Kreuzkontamination des Trinkwassersystems mit Abwasser stattfand, ist auf Non-A/Non-B-Viren zurückzuführen.

Penetration of *E. coli* and F2 Bacteriophage into Fish Tissues

B. Fattal, A. Dotan, Y. Tchorsh, L. Parpari and H. I. Shuval

ABSTRACT

Throughout the world, fish thrive in rivers, lakes and seawater polluted with wastewater. Furthermore, in some countries, wastewater-enriched fishponds are used for fish cultivation. One of the major constraints in using wastewater for aquaculture is the possible contamination of the fish by enteric pathogens (bacteria and viruses), which may penetrate and accumulate in fish tissue, and constitute a potential public health hazard, especially in countries in which raw fish are consumed.

In order to evaluate the infection of fish cultivated in wastewater, controlled experiments were performed to study the penetration of bacteria and bacteriophage inoculated into water tanks in which the fish were maintained.

Twenty to thirty Tilapia hybrids (*Sarotherodon aureus* x *S. niloticus*), of 100 gr average weight and some 20 cm long were introduced into a 1 m³ plastic tank, containing about 500 l tap water at a temperature of 20°C. High protein fish feed was added at a rate of about 1% of body weight per day.

Four experiments were performed using an inoculum of an *E. coli* strain resistant to streptomycin and nalidixic acid. One hour after inoculation, bacterial concentration was 10^5 - 10^6 /ml tank water. Four experiments were carried out with F2 male-specific bacteriophage 10^3 - 10^5 /ml tank water. In each experiment two fish were sacrificed at zero time (prior to introduction of inocula), and 1, 5, 24, 48 and 72 or more hours after inoculation. Water samples were withdrawn at the same intervals.

The level of microorganisms was tested in the following tissues: digestive tract, skin, spleen, liver and muscle. *E. coli* assays were performed using the membrane filtration technique; phages were assayed, using *E. coli* host cells in a plaque assay.

The results of the experiments indicate that notwithstanding the high *E. coli* concentration in the tank water, its level in the edible tissue (muscle) was low, and in no instance higher than the acceptable standard of 400 cfu/gr (International Commission for Food Specification, 1974). The maximum concentration of F2 phage detected in muscle tissue was 350 pfu/gr. There is no standard for virus concentration in edible tissue.

1. INTRODUCTION

Throughout the world fish thrive in rivers, lakes, seawater and ponds polluted with wastewater. Currently, one would be hard pressed to find any surface water, including that used in aquaculture, that is free of wastewater. This pollution may be either overt as in fish ponds, or covert as in rivers and other surface water.

In some countries, wastewater-enriched fishponds are commonly used for fish cultivation. The production of fish in ponds fertilized with human wastes is an ancient practice in many parts of Asia, and it was also known in medieval Europe. Wastewater fertilization of ponds was encouraged in Germany at the end of the 19th century, and independently in Calcutta in 1930, where it evolved into the world's largest wastewater aquaculture system. There are now more than 130 wastewater fisheries in India, encompassing 12,000 ha of pond area, and wastewater is used for aquaculture in a range of other countries, including the Federal Republic of Germany and Hungary. With the widespread implementation of stabilization ponds in wastewater treatment, there has been increasing interest in fish production in the final pond. Most of the existing aquaculture waste reuse systems handle raw or partially-treated wastewater, generally following extensive dilution to avoid undue oxygen depletion.

A major constraint in using wastewater for aquaculture is the potential contamination of fish by enteric pathogens (Edwards, 1985). These microorganisms (bacteria and viruses) may penetrate and accumulate in fish tissues, constituting a potential public health hazard, particularly in countries where raw fish is consumed. For a review of the use of human wastewater in aquaculture and Public Health considerations see Edwards (1987).

There are several advantages in growing fish in wastewater for enriched aqua-systems: the increased supply of natural nutrients results in higher fish yields. The pond's capacity for wastewater treatment is by reducing BOD (Biological Oxygen Demand) and bacterial counts, as well as by removing nutrients. Also the resulting high-quality water obtained can be utilized for agricultural purposes. However, there are some limitations involved in wastewater aquaculture, including dissolved oxygen deficit, the possible presence of toxic compounds (insecticides and herbicides, heavy metals, oils, and detergents), and sanitary considerations. For a review of the use of wastewater in Israeli aquaculture, see Hepher and Schroeder (1977).

Laboratory studies have shown that viruses may be accumulated by bottom-feeding fish which eat contaminated worms (Metcalf, 1975). Buras et al. (1985, 1987) have shown that fish grown in ponds to which wastewater has been added, can accumulate bacteria and that above a threshold concentration of some 10^4 /ml pond water, detectable microbial levels are present in muscle tissue. Although fish usually do not suffer from infections by *Salmonella*, *Shigella* or other enterobacteria, these organisms may survive and accumulate in the gut, mucus and tissues. Some investigators (Butiaux, 1962, Guelin, 1962) contend, however, that these pathogens are passively carried by the fish and that prior to marketing the fish may be depurated within a few days by transferal to fresh water ponds. Strauss (1985) reviewed the literature on the survival of pathogens in and on fish and concluded that invasion of pathogens into fish tissues increased with the duration of exposure to the contaminant.

The purpose of this work was to study bacterial and viral penetration, uptake and accumulation in tissues of fish grown in polluted water, as a model of infection in wastewater aquaculture.

2. MATERIALS AND METHODS

Twenty to thirty Tilapia hybrids (*Sarotherodon aureus* x *S. niloticus*), average weight 100 gr, and length 20 cm, were introduced into a 1 m³ plastic tank, containing some 500 l tap water at a temperature of 20°C.

The tank was located in a polyethylene-covered shed with little natural illumination, allowing for minimal algal growth. The water was intensively aerated, using porous plastic tubing (Mitzpe Plastic Tubes Industry); neither water exchange nor filtration was practiced. High protein pellet fish feed was added at the rate of 1% body weight per day. This quantity allows for maintenance of the fish but does not permit growth. An acclimatization period of at least seven days preceded the experiment. During this period no fish mortality was observed.

Six experiments (a total of 69 fish) were performed in this study:

- a) Two experiments with a total of 20 fish were carried out using an inoculum of *E. coli*. One hour after inoculation there were 10^5 - 10^6 Colony Forming Units (CFU) per ml tank water.
- b) Two experiments (with a total of 22 fish) were performed using an inoculum of F2 male specific bacteriophage (F2 phage). One hour after inoculation there were 10^3 - 10^5 Plaque Forming Units (PFU) per ml tank water.
- c) Two additional experiments (with a total of 27 fish) were carried out using a dual inoculation of *E. coli* and F2 phage. At the conclusion of these trials, each tissue sample was tested for the presence of both microorganisms.

Prior to inoculation, an *E. coli* strain resistant to streptomycin and nalidixic acid was cultured in 500-1000 ml nutrient broth (Difco) for 18-24 hours at 37°C, using a thermostatic shaker. The final titer of the culture was 2×10^8 - 5×10^8 cfu/ml. The phage F2 stock was prepared by adding the phage to a culture of *E. coli* (10^8 cells/ml), grown for 3.5-4.5 hours at 37°C in Tryptone-Yeast Extract-Dextrose-CaCl₂ (TYDC) medium at a ratio of about 3:1 phages/host cells. After additional incubation of 4-8 hours the culture was centrifuged yielding a final concentration of 10^{10} - 10^{11} pfu/ml.

Two fish were sacrificed at zero time prior to introduction of the inocula, and 1, 5, 24 and 48 hours following inoculation. Water samples were also withdrawn at these intervals and tested as well as the fish tissues. The microbial levels were examined in the following tissues: digestive tract (D.T.), skin, spleen, liver and muscle. Prior to sacrifice, the fish were anaesthetised with about 200 mg/l of MS-222 (tricaine methanesulfonate). A piece of skin (area: 6-15 cm²) was excised from the lateral integument by a sterile scalpel. The skin was then aseptically detached from the underlying muscle tissue. In order to avoid cross-contamination the muscle tissue (weight 2-3 gr) was removed at a distance of 2 mm from the edge of the cut skin. The ventral surface of the fish was cut open and the peritoneal cavity exposed, using standard aseptic procedures. The digestive tract was then cut free between the esophagus and the rectum and transferred to a Petri dish after removing the attached bile and fatty tissue.

Digestive tract weights ranged from 1.9 to 9.1 gr, depending on fish size and the amount of gut content. Samples of removed spleen and liver were also examined. After the addition of phosphate buffered saline, each tissue sample was homogenized in an Omni Mixer (Sorval Inc.) for 5 minutes at low speed. Spleen and liver were manually homogenized in a glass homogenizer. For bacteriological assays, homogenates and water samples were diluted in PBS and assayed by membrane filtration, using m-Tec medium (Dufour et al., 1981), supplemented with 50 ppb streptomycin and nalidixic acid.

For phage assays, the homogenates were centrifuged and the supernatants, mixed with *E. coli* host cells, cultured for 3.5-4.5 hours at 37°C prior to mixing were poured over Tryptone-Dextrose agar plates. The plates were incubated for 24 hours at 37°C.

3. RESULTS

Figures 1-6 show the log means of *E. coli* and phage F2 in water, digestive tract, skin, spleen, liver and muscles at zero time and 1, 5, 24, 48 and 72 hours following inoculation. Four experiments were carried out using an inoculum of *E. coli* and four with phage F2. In two of these trials both *E. coli* and phage F2 were included in the inoculum. The tissue values are the means of eight fish, and mean water values are based on 4 samples.

Microorganisms in water following inoculation

It can be seen from Fig. 1 that the water concentration of *E. coli* was 10^6 CFU/ml 1 hour after inoculation, and then decreased log linearly. The level of phage F2 was 10^4 PFU/ml 1 hour after inoculation, with a more moderate decrease in time than that of *E. coli*.

Microorganisms in tissues following inoculation

Fig. 2 shows that in the digestive tract there was a gradual increase in the concentration of both *E. coli* and phage F2, peaking between 5 and 24 hours after inoculation, then decreasing. The peak concentration of both microorganisms in the digestive tract tissue were similar to the levels found in the water 1 hour after inoculation: up to 10^5 CFU/gr for *E. coli* and $10^{3.5}$ PFU/gr for phage F2.

As seen in Fig. 3 the concentration of *E. coli* on the skin also rose, peaking at 10^3 CFU/cm² 5 hours after inoculation, then dropping. The concentration of phage F2 on the skin remained essentially the same ($10^{1.2}$ PFU/cm²) for 48 hours and then decreased.

The log means concentration of both microorganisms in spleen and liver were low and fluctuated without any clear trend (Figs. 4, 5). The *E. coli* concentrations in liver and spleen were 10-100 CFU/gr and 10^2 CFU/gr, respectively. The phage F2 concentrations in liver and spleen were 5-10 PFU/gr and 10-100 PFU/gr, respectively.

In the edible tissue (muscle) the maximum values obtained for both microorganisms were always lower than 100 CFU or PFU/gr. In most instances the readings were below detectable level (Fig. 6).

Dual inoculum experiments

The log means of *E. coli* and phage F2 in water and tissue, 5 and 24 hours following dual inoculation, are presented in Figs. 7 and 8. The results of these experiments were similar to those described in Figs. 1-6. As may be seen in Figs. 7 and 8, the highest concentrations of microorganism were found in the digestive tract, and the lowest in muscle, where *E. coli* could not be detected 5 hours after inoculation. Twenty four hours following inoculation the *E. coli* level in the digestive tract was higher than that in water, with the concentration of phage F2 slightly lower than that in the water.

Correlation between tissue penetration of *E. coli* and phage F2 following dual inoculation

Table 1 shows the Pearson correlation coefficients between *E. coli* and phage F2 assayed in the same fish tissue in the two experiments shown in Figs. 7 and 8. Statistically significant correlations were found only for spleen and digestive tract (0.93 and 0.67, respectively). No correlation was found in the other tissues examined.

4. DISCUSSION

The results of our preliminary experiments show that following the introduction of *E. coli* and phage F2 into water tanks in which fish were maintained, the microorganism levels in edible tissue were extremely low, with values never exceeding the acceptable standard of 400 CFU/or PFU/gr (ICMSF-International Commission on Microbiological Specification for Foods, 1974). In several samples undetectable values were obtained. It should also be noted that in order to assure appropriate conditions for infection, the concentrations of *E. coli* and phage F2 used in the inocula were several logs higher than those found in natural wastewater environments, and those used by Buras et al. (1985). Although, as discussed in Materials and Methods, attempts were made to avoid cross-concentration, it can not be ruled out that the positive results obtained for muscle were, in fact, due to skin cross-concentration during excision. The true microorganism count in muscle may, therefore, be even lower than that found. At any rate, the potential health hazards posed by consumption of such "contaminated" muscle is probably low, particularly in view of the fact that fish are generally cooked before eating. However, there is the possibility of cross-contamination of kitchen utensils and surface from digestive tract contamination during cleaning and preparation of fish.

No association was found between the initial inoculum of *E. coli* and phage F2 in water and the concentration of these microorganisms in skin, spleen, liver and muscles.

Although the results are presented as log means, there were wide variations in the level of *E. coli* and phage F2 in the tissues of the individual fish examined. This may be due to physiological differences among the specimens or stress factors of the individual fish which may affect the immune mechanism, or other factors facilitating penetration of microorganisms into fish tissue.

In the present experiment, the levels of *E. coli* and phage F2 in the digestive tract peaked 5-24 hours after inoculation and then decreased. Buras et al. (1985) found that after introducing bacteria directly into the esophagus, the microorganism could be detected in muscle tissue after 30 minutes. This indicates that the digestive tract may serve as a conduit for tissue infection.

In the dual inoculum experiments, a correlation between the penetration of *E. coli* and phage F2 into the fish tissue was found only for the digestive tract and spleen. No correlation was found in the other tissues examined, although this may be attributable to the small number of specimens tested. The mode of penetration of bacteria and viruses and the possibility of similar mechanisms being involved remain to be elucidated.

These preliminary results of experiments, conducted in water highly contaminated with microorganisms, suggest that wastewater aquaculture does not lead to contamination of edible fish tissue above the acceptable levels.

5. ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the US Agency for International Development (USAID) for funding this research through the New Jersey Marine Sciences Consortium, which was performed within the framework of the Egypt-Israel-USA Regional Cooperation Program for the Middle-East. Special thanks are due to Ms. Sara Mymon for her excellent technical assistance.

6. REFERENCES

- Buras, N., Duek, L., and Niv, S.: Reactions of fish to microorganisms in wastewater. *Applied Environm. Microbiology* 50 (1985), 989 - 995
- Buras, N., Duek, L., Niv, S., Hefer, B., and Zandbank, E.: Microbiological aspects of fish grown in treated wastewater. *Wat. Res.* 21 (1987), 1 - 10
- Buttiaux, R.: Salmonella problems in the sea. In: G. Borgstrom (ed.), *Fish as Food*, Vol. 2, pp. 503 - 519, Academic Press, New York, 1962
- Dufour, A.P., Strickland, E.R., and Cabelli, V.J.: Membrane filter method enumerating Escherichia coli. *Applied Environm. Microbiology* 41 (1981), 1152 - 1158
- Edwards, P.: Aquaculture: A component of low cost sanitation technology. Technical Paper Number 36, World Bank, Washington, D.C., 1985
- Edwards, P.: Public Health Aspects, Use of human wastes in aquaculture - A state-of-the-art review. (Division of Agricultural and Food Engineering, Asian Institute of Technology), 1987
- Guelin, A.: Polluted waters and the contamination of fish. In: G. Borgstrom (ed.), *Fish as Food*, Vol. 2, pp. 481 - 502, Academic Press, New York, 1962
- Hepher and Schroeder: In: F.M. D'atri (ed.) *Wastewater Renovation and Reuse. Wastewater Utilization in Israel Aquaculture*, p. 529 - 559, Marcel Dekker Inc., N.Y., 1977

ICMSF: Microorganisms in Food. 2. Sampling for Microbiological analysis: Principles and Specific Applications. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), University of Toronto and Buffalo, 213 pp., 1974

Metcalf, T.G.: Final Report, GI 38976: RANN Program, National Science Foundation, 1975

Strauss, M.: Survival of excreted pathogens in excreta and faecal sludges, IRCWD News 23 (1985), 4 - 9

Tab. 1: Pearson correlation coefficients (r) between *E. coli* and phage F2 concentrations in various fish tissues

Fish tissue	r	No of fish examined	Level of significance
digestive tract	0.67	8	p=0.03
skin	0.31	7	p=0.24
spleen	0.93	8	p=0.0001
liver	-0.17	4	p=0.41
muscle	0.58	4	p=0.20

Fish were sacrificed 5 or 24 hours after dual inoculation. Mean values are presented in the Table

PHAGE F2 AND E.COLI VALUES IN WATER

ALL EXPERIMENTS

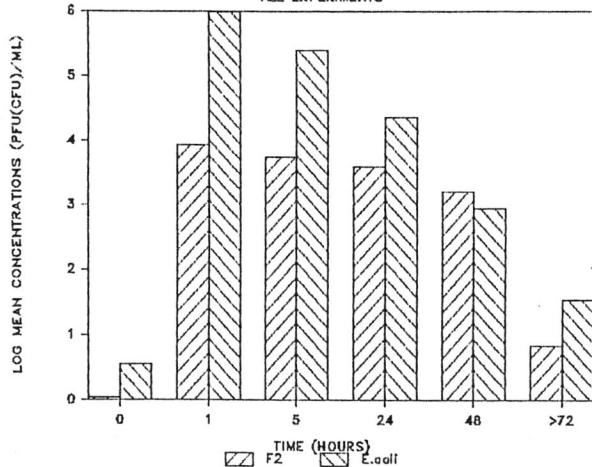


Fig. 1: Log means of phage F2 and E. coli in the water following inoculation

Four experiments were carried out for each microorganism: 24 samples were assayed for phage F2 and 21 samples for E. coli

PHAGE F2 AND E.COLI VALUES IN D.T.

ALL EXPERIMENTS

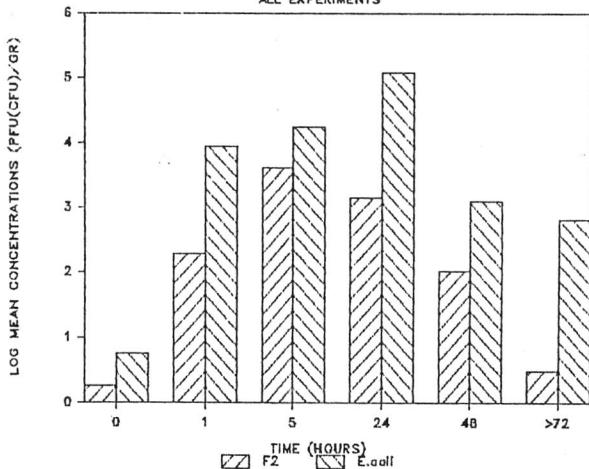


Fig. 2: Log means of phage F2 and E. coli in the digestive tract following inoculation

Four experiments were carried out for each microorganism: 49 fish were assayed for phage F2 and 42 fish for E. coli

PHAGE F2 AND E.COLI VALUES IN SKIN ALL EXPERIMENTS

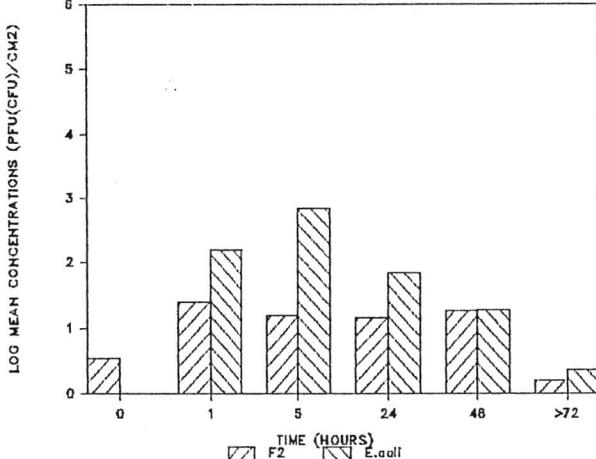


Fig. 3: Log means of phage F2 and E. coli in the skin following inoculation

Four experiments were carried out for each microorganism: 49 fish were assayed for phage F2 and 44 fish for E. coli

PHAGE F2 AND E.COLI VALUES IN SPLEEN ALL EXPERIMENTS

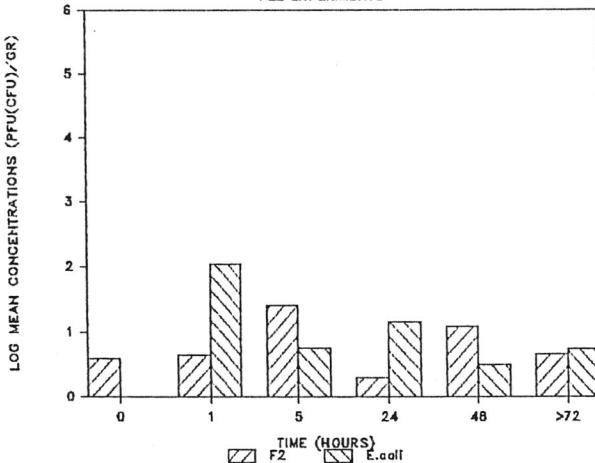


Fig. 4: Log means of phage F2 and E. coli in the spleen following inoculation

Four experiments were carried out for each microorganism: 48 fish were assayed for phage F2 and 44 fish for E. coli

PHAGE F2 AND E.COLI VALUES IN LIVER

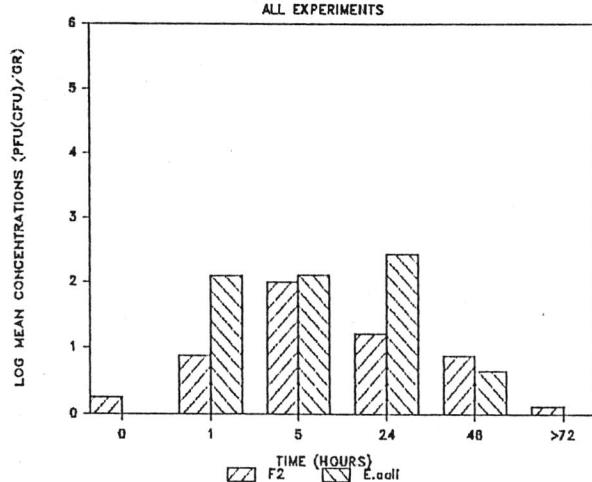


Fig. 5: Log means of phage F2 and E. coli in the liver following inoculation

Four experiments were carried out for each microorganism: 49 fish were assayed for phage F2 and 32 fish for E. coli

PHAGE F2 AND E.COLI VALUES IN MUSCLE

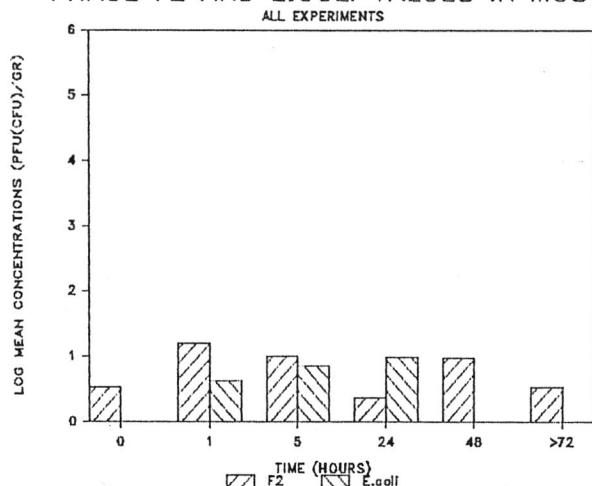


Fig. 6: Log means of phage F2 and E. coli in the muscle following inoculation

Four experiments were carried out for each microorganism: 35 fish were assayed for phage F2 and 32 fish for E. coli

MEANS OF PHAGE F2 AND E.COLI IN TISSUES

ALL EXPERIMENTS, 5 HR AFTER INOCULATION

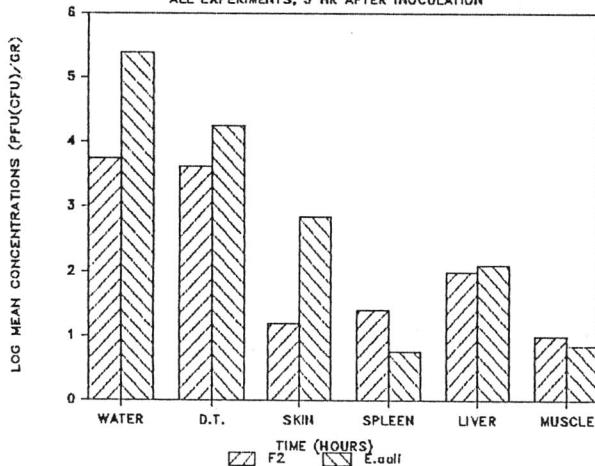


Fig. 7: Log means of phage F2 and E. coli in water and fish tissues 5 hours after dual inoculation

4 fish were assayed for both phage F2 and E. coli in 2 experiments

PHAGE F2 AND E.COLI VALUES IN TISSUES

ALL EXPERIMENTS, 24 HR AFTER INOCULATION

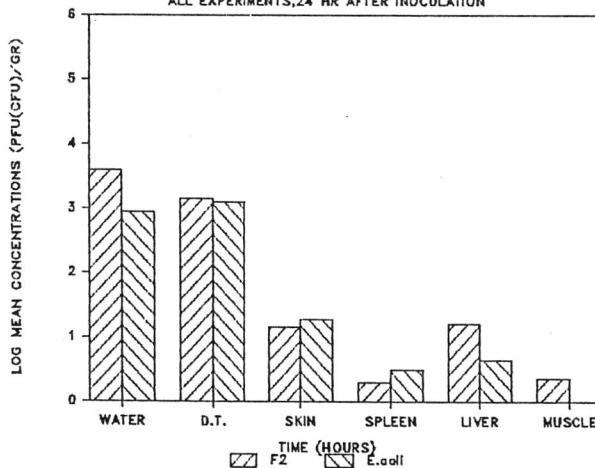


Fig. 8: Log means of phage F2 and E. coli in water and fish tissues 24 hours after dual inoculation

4 fish were assayed for both phage F2 and E. coli in 2 experiments

Viren in Flüssig- und Festmist sowie im Abwasser von Schlachtanlagen

J. Wekerle

ZUSAMMENFASSUNG

Von landwirtschaftlichen Nutztieren mit akuten oder latenten Virusinfektionen ausgeschiedene Viren sammeln sich in den festen und flüssigen tierischen Abgängen (Festmist, Flüssigmist) und kontaminieren Oberflächen des Stallbereichs. Sie behalten dort unter gewissen Umständen ihre Aktivität für lange Zeit. Durch die landwirtschaftliche Verwertung der tierischen Abgänge als organische Dünger und über andere Vektoren können diese Viren in die Umgebung gelangen und so möglicherweise auch das Wasser kontaminiert. Eine Gefährdung der landwirtschaftlichen Nutzterbestände und, soweit es sich um Zoonoseviren handelt, auch des Menschen, kann nicht ausgeschlossen werden. Eingehende Untersuchungen über das Ausmaß einer Kontamination des Wassers mit von landwirtschaftlichen Nutztieren stammenden Viren existieren allerdings nicht. Weitere Untersuchungen, insbesondere im Hinblick auf eine Risikoabschätzung sind notwendig.

Zur Virusbelastung des Abwassers aus Schlachtanlagen werden die vorhandenen wenigen Literaturdaten zusammengefaßt. Durch Querverbindungen zu ähnlichen Problemkreisen (Wasser/Abwasservirologie) wird versucht, diese im Ansatz zu erweitern.

EINLEITUNG

Landwirtschaftliche Nutztiere mit akuten oder latenten Virusinfektionen scheiden die Erreger in bestimmten Fällen über verschiedene Pforten aus. Die Erreger kontaminieren zunächst Oberflächen des Stallbereiches in unmittelbarer Umgebung der Tiere um sich schließlich in den festen und flüssigen tierischen Abgängen (Festmist, Flüssigmist, Jauche) zu sammeln. Somit ist nach Strauch

[13] der Boden der Tierställe mit allen Einrichtungen für die Entsorgung der tierischen Abfälle als Sammelbecken für Pathogene von allen Tieren des jeweiligen Bestandes anzusehen. Demgemäß müssen auch die tierischen Abfälle selbst bei jeder Infektionskrankheit innerhalb eines Tierbestandes als infektiös und unbelebter Vektor für den entsprechenden Krankheitserreger angesehen werden.

Für die Beurteilung hieraus resultierender epidemiologischer Effekte ist zunächst die Kenntnis der Virusarten und -mengen, der Austrittspforten sowie der entsprechenden virushaltigen Substrate notwendig. Weiter sind chemisch-physikalische und biologische Faktoren zu berücksichtigen, welche die Aktivität von Viren im Stallbereich beeinflussen und so zu einer Hemmung bzw. Förderung der Virusverbreitung beitragen. Mögliche Infektionsketten, ausgehend von viruskontaminierten tierischen Abfällen über belebte und unbelebte Vektoren bis hin zum Menschen und Tier sind weit verzweigt und zahlreich.

Zum Vorkommen und Verhalten von Viren in Schlachthofabwässern liegen nur wenige Literaturdaten vor. Bezeichnend ist die Tatsache, daß durch eigene intensive Literaturstudien als auch durch computergestützte Recherchen nur eine Literaturstelle zum genannten Themenkreis ermittelt werden konnte. Der Versuch einer Erweiterung dieser Informationen durch Querverbindungen zu ähnlichen Problemkreisen (Wasser/Abwasservirologie), kann deshalb allerhöchstens als Ansatz und teilweise Spekulation gewertet werden. Sie bedürfen im Hinblick auf eine Virusverbreitung über Schlachthofabwässer sowie die Eliminierung von Pathogenen in diesem Substrat durch bestimmte Behandlungsverfahren weiterer Untersuchungen.

VIRUSARTEN UND -MENGEN IN TIERISCHEN ABGÄNGEN IM LANDWIRTSCHAFTLICHEN BEREICH

Tierische Abgänge im landwirtschaftlichen Bereich fallen hauptsächlich in fester und flüssiger Form an. Festmist, ein Gemisch aus Kot, Stroh- und Jaucheanteilen, fällt vor allem bei traditionellen Haltungsformen mit Einstreu an. Bei heutigen Methoden der Tierhaltung werden insbesondere Bestände mit hohen Tierzahlen durch Erfassung und Sammlung der tierischen Exkremeante Kot und Harn als Flüssigmist entsorgt.

Wie bereits erwähnt, sind Fest- und Flüssigmist sowie Oberflächen der Tierstallungen und deren Einrichtungsgegenstände als Sammelbecken für sämtliche Pathogene, die von den Tieren eines Bestandes ausgeschieden werden können, anzusehen. Dies gilt gleichermaßen für Viren, Bakterien und Parasiten [14].

Erschwerend kommt hinzu, daß eine aus betriebswirtschaftlichen Gründen praktizierte Konzentration vieler Tiere auf engem Raum, verbunden mit einem häufigen Generationswechsel, zu einer erhöhten Gefährdung der Tiere durch Krankheitserreger führt. Die derzeit zu beobachtende laufende Zunahme von Virusinfektionen in landwirtschaftlichen Beständen (z.B. Rota-Virusinfektionen beim Schwein und Rind; die epizootische Virusdiarrhoe, durch ein Corona-Vi-

rus hervorgerufen; die Transmissible Gastroenteritis-TGE; die Schweineinfluenza) und in ihrer Folge von Enteritisserkrankungen sprechen für sich.

Grundlegend für die Kontamination von Flüssigmist, Festmist und Stallbereich ist die Erregerausscheidung durch infizierte Tiere über bestimmte virushaltige Substrate. Diese wiederum müssen in die tierischen Abgänge und den Stallbereich gelangen, um als potentielle Kontaminanten angesehen werden zu können. Die Möglichkeit der direkten und indirekten Ausscheidung von Pathogenen durch infizierte Organismen wird in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 2 faßt diejenigen tierischen Virusarten zusammen, mit deren Vorkommen in Fäces, Sekreten und Exkreten in teilweise hohen Mengen gerechnet werden muß.

Insgesamt sind Kenntnisse über die gesamte Palette und das Verhalten von Viren in landwirtschaftlichen Abgängen im Vergleich zu bakteriologischen Erfahrungen begrenzt.

Derbyshire [1] führte in den Vereinigten Staaten eine Studie über Virusarten, die von landwirtschaftlichen Tierbeständen ausgeschieden werden können, durch. Die Vielfältigkeit der dabei ermittelten Virusarten ist der Tabelle 3 zu entnehmen. Diese Verhältnisse müssen nach Strauch [13] jedoch nicht ausschließlich für Nordamerika zutreffen, sondern können, abgesehen von lokalen Abweichungen, im Analogieschluß auch auf die übrigen Teile der Welt übertragen werden.

Nach Derbyshire [1] scheiden Rinder mit den Fäces eine breite Palette von Virusarten aus. Zu ihnen gehören bovine Enteroviren, bovine Adenoviren, Reoviren und "Reovirus-like"-Agentien, bovine Parvoviren, ein bovinus Coronavirus und der Erreger der bovinen Virusdiarrhoe. Zwischen bovinen und humanen Enteroviren einschließlich Poliovirus Typ 2 wurden antigene Ähnlichkeiten festgestellt. Einige der bovinen Adenovirus-Serotypen besitzen ein gruppenspezifisches Antigen, das bei den meisten Säuger-Adenoviren einschließlich derjenigen des Menschen, verbreitet ist. Das bovine Adenovirus Typ 3 zeigte bei Hamstern onkogene Eigenschaften. Reoviren vom Rind wurden ebenfalls isoliert, wobei die Infektion mit den drei bekannten Typen serologisch nachzuweisen war. Die Möglichkeit der Infektion von Menschen mit bovinen Reoviren wird eingeraumt, weil Menschen experimentell mit den Typen 1 eines bovinen Reovirusstammes infiziert werden konnten und Rinder empfänglich für humane Virusstämme sind. Eine Ähnlichkeit von "Reovirus-like-Agent", das bei neugeborenen Kälbern Diarrhoe verursacht, mit den tatsächlichen Reoviren wird nicht bestätigt. Bovine Parvoviren, die in Rinderbeständen weit verbreitet sind, erscheinen mit denen anderer Spezies nicht verwandt zu sein. Weitere Erreger von Durchfällen bei Kälbern sind das bovine Rotavirus und das bovine Coronavirus. Das letzte genannte Virus ist als Vertreter der behüllten Viren im Vergleich zu vorgenannten unbehüllten Virusarten als weniger stabil einzustufen.

Enteroviren werden in den Fäces von Schweinen regelmäßig nachgewiesen. Serologische Ähnlichkeiten zwischen den porcinen und den humanen Enteroviren konnten nicht festgestellt werden. Ein Stamm des Reovirus Typ 1 konnte aus Schweinfäces isoliert werden, Adenoviren kommen im Verdauungstrakt von Ferkeln vor. Porcine Adenoviren besitzen ein gruppenspezifisches Antigen gemeinsam mit menschlichen Adenoviren, Kreuzreakтивität konnte bislang jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

Die humanen Adenovirustypen 1, 2, 5 und 6 gehen bei experimentell infizierten Ferkeln an und somit kann die Möglichkeit, daß Schweine Träger und Ausscheider menschlicher Adenoviren sein können, nicht ausgeschlossen werden. Parvovirus-Infektionen bei Schweinen sind weit verbreitet und diese außergewöhnlich stabile Virusart bleibt in Wasser lange infektiös. Eine andere wichtige enterische Virusart beim Schwein, der Erreger der Transmissible Gastroenteritis, verliert als Coronavirus seine Aktivität unter Umwelteinflüssen schnell. Neben den typischen Schweinestämmen werden nach Strauch [14] immer häufiger Infektionen von Schweinen mit menschlichen Influenzavirusstämmen im Zusammenhang mit Seuchenzygen beim Menschen beobachtet. Die vom Menschen stammenden Viren können über Jahre in den Schweinepopulationen als inapparente Infektionen persistieren, weshalb heute das Schwein als mögliches Reservoir für menschliche Influenzavirusstämme angesehen wird. Influenzaviren des Schweines besitzen nur eine geringe Tenazität. Ihre Ausscheidung auf fäkalem Weg wird als unwahrscheinlich angesehen. Trotzdem können sie über das Nasensekret auf den Stallfußböden und damit in die Fäkalzone gelangen. Hier dürfte es allerdings zu einer raschen Inaktivierung kommen.

Über die Isolierung von Entero-, Adeno- und Reoviren aus den Fäces von Schafen wird berichtet.

Ecthyma contagiosum bei Schafen wird verursacht durch ein Mitglied der Paravacciniavirus-Gruppe und ist auf den Menschen übertragbar. Der Erreger des Scrapie ist in der Umwelt außerordentlich stabil, eine Übertragung über das Wasser und infizierte Weiden ist denkbar. Die Kuru und die Creutzfeld-Jakob-Erkrankung des Menschen zeigen große Ähnlichkeiten mit Scrapie in Bezug auf die klinischen Symptome, die Neuropathologie, die Epizootologie und den Erreger [10].

Viruserkrankungen beim Geflügel mit ökonomischem Interesse sind Newcastle Disease, Geflügelinfluenza, infektiöse Bronchitis und infektiöse Laryngotracheitis. Jede dieser Virusarten wird vorwiegend auf dem Luftwege übertragen. Die Marek'sche Krankheit wird durch ein Virus verursacht, das in Hautschuppen infizierter Tiere enthalten ist und so in den Staub und die Streu der Geflügelflässe gelangt. Die wichtigsten enterischen Viren des Geflügels sind den Entero-, Adeno- und Reoviren zuzuordnen. Diese Viren scheinen mit Säuger-Serotypen nicht verwandt zu sein, obgleich mindestens ein Adenovirus des Geflügels in Hamstern onkogene Eigenschaften zeigte.

Diese Informationen konnte Mack et al. [5] speziell im Hinblick auf das Vorkommen des Erregers der Aujeszky'schen Krankheit, einem Virus aus der Herpesgruppe, in den festen und flüssigen Abgängen sowie der Luft infizierter Schweinebestände, erweitern. Zur Erläuterung sei angemerkt, daß die Aujeszky'sche Krankheit der Schweineproduktion der Bundesrepublik Deutschland in den letzten Jahren Verluste in Millionenhöhe zugefügt hat.

Tabelle 4 zeigt, daß ein großer Teil der Gülle- und Luftproben aus seropositiven Tierbeständen bzw. Beständen mit symptomatischen klinischen Erscheinungen mit Aujeszkyviren kontaminiert war.

Über Virusgehalte in Fäces beim Auftreten ausgewählter Viruskrankheiten bei Tieren machte Sellers [12] detaillierte Angaben (Tabelle 5).

STABILITÄT VON VIREN IN TIERISCHEN ABGÄNGEN UND IM STALLBEREICH

Nach der Ausscheidung und Überführung der viralen Erreger in das entsprechende Substrat in der Umgebung der Tiere unterliegen sie dort physikalischen, chemischen und biologischen Einflüssen. Inwieweit diese zur Erhaltung der Infektiosität oder Inaktivierung des Erregers führen, hängt von der Art und Zusammensetzung des Substrates, von chemischen und physikalischen Gegebenheiten aber auch vom Aufbau und der Tenazität des Erregers selbst ab. Ein wichtiger Punkt bei der Beurteilung relevanter epidemiologischer Effekte ist die Tatsache, daß tierische Virusarten nach der Ausscheidung teilweise einer starken Verdünnung unterliegen. Dies trifft vor allem für die Kontamination flüssiger und fester tierischer Abgänge zu. Im Gegensatz zu Bakterien fehlt viralen Erregern die Möglichkeit, sich in solcher Umgebung zu vermehren. Dies wiederum führt zu einer Stagnation bzw. Reduktion der absoluten Menge viraler Erreger. Eine Zusammenstellung der Stabilität exemplarisch ausgewählter Viren mit Bedeutung im Stallbereich wurde nach zahlreichen Literaturangaben in den Tabellen 6 und 7 gemacht.

EPIDEMIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON VIREN IN FLÜSSIGEN UND FESTEN TIERISCHEN ABFÄLLEN

Die Tatsache, daß bestimmte Virusarten in tierischen Abfällen teilweise längere Zeit ihre Infektiosität erhalten, wirft die Frage der epidemiologischen Bedeutung viruskontaminiierter tierischer Abfälle auf.

Hanks [3] stellt in schematischer Weise die Beziehungen zwischen tierischen Abfällen und Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier dar (Abb. 1).

Diese Darstellung gilt gleichermaßen für alle Erregergruppen (Viren, Bakterien und Parasiten). Insgesamt listet Hanks sieben Infektionsketten für die Übertragung von Krankheitserregern, ausgehend von erregerhaltigen tierischen Abfällen, auf Mensch und Tier auf. Neben verschiedenen Möglichkeiten der Wei-

terverbreitung wie direkten Kontakt, Fliegen, Nager usw. wird speziell Wasser als Quelle von Infektionen aufgezeigt, die über direkten Kontakt oder Aufnahme zu menschlichen Infektionen führen kann.

Übereinstimmend führen verschiedene Autoren aus, daß ausführliche epidemiologische Studien zur Bedeutung von Verunreinigungen des Wassers mit von Tieren stammenden Viren fehlen [9, 13]. Bekannt sind lediglich diejenigen Zoonoseviren, die vom Tier in das Wasser gelangen können. Mayr [9] faßt diese mit ihrer Widerstandsfähigkeit im Wasser tabellarisch zusammen (Tab. 8). Der Autor gibt an, daß wichtige Zoonoseviren zwar ins Wasser gelangen können, dabei jedoch zwischen Virusarten unterschieden werden muß, die sehr stabil sind und solchen, die sich im Wasser nicht lange infektionsstüchtig halten. Hierdurch engt sich das Spektrum der für den Menschen gefährlichen Zoonoseviren beträchtlich ein. Nach Mayr [9] dürften für den Menschen die größte Bedeutung die Rota-, REO- und Schweinepicornaviren (Vesicular Exanthem, Vesicular Disease) haben, die alle relativ stabil sind.

Darüber hinaus gilt das Interesse nur durch spezifisch menschenpathogene Viren verursachten Erkrankungen, für die ganz klare Ursache-Wirkungs-Relationen bekannt sind. An erster Stelle rangieren die Hepatitis-A- und Polioviren, bei den gefundenen Coxsackie-, ECHO-, Parvo- und Adenoviren ist die Beziehung zwischen Wasser und Erkrankungen schon nicht mehr gesichert. Weitere Bedeutung mißt der Autor den REO- und Rotaviren, mit Einschränkung auch den Parvoviren zu.

Virale Risikofaktoren bei Tränk- und Brauchwasser für die Tierbestände selbst stellt Mahnel [6] zusammen. Der Autor gibt erläuternd an, daß die epidemiologischen Erkenntnisse der letzten Jahrzehnte eindeutig darauf hinweisen, daß in zivilisierten Gebieten für Tiere, die mit gutem Leitungs- oder Brunnenwasser getränkt werden, nur ein äußerst geringes, minimales Ansteckungsrisiko gegeben ist. Etwas größer und nicht vernachlässigbar ist jedoch das Risiko sekundärer Kontamination von an und für sich virusfreiem Wasser innerhalb von Tierhaltungen, wenn im Verlauf von Virusinfektionen bestandsinternes Virus verstreut wird. Diese Risiken können durch entsprechende hygienische Maßnahmen minimiert werden.

Aus der Erkenntnis heraus, daß tierische Abfälle grundsätzlich mit Krankheitserregern aller Gruppen angereichert sind und so zu einer Gefahr zumindest für Tiere in unmittelbarer Nachbarschaft sowie für die Öffentlichkeit werden können, hat sich eine Arbeitsgruppe der Europäischen Gemeinschaft zum generellen Schutz der Umwelt vor Krankheitserregern allgemein für Gülle auf eine "minimale Leitlinie" geeinigt. Im einzelnen besagt diese:

1. Flüssigmist sollte, wann immer möglich, nur bei Ackerfrüchten angewendet werden (mit Ausnahme von solchen zum Rohverzehr).
2. Bei Flüssigmistanwendung auf Grünland sollen bevorzugt für Konservierung bestimmte Flächen benutzt werden. Wenn Weideland herangezogen werden muß, sollte der Flüssigmist zuvor 60 Tage gespeichert werden; nach der

Ausbringung soll eine KARENZZEIT von 30 Tagen eingehalten, und es sollten nur erwachsene und nicht empfängliche Tiere aufgetrieben werden.

3. Die Anwendung von Flüssigmist soll in Relation zu den Ernährungsbedürfnissen der Pflanzen stehen.

Weiter wird empfohlen, Flüssigmist im Winter mindestens 90 Tage zu lagern, was die Notwendigkeit von 2 Lagerbehältern bedeutet. Flüssigmist, der aus lager- bzw. entsorgungstechnischen Gründen im Stall gesammelt wird, birgt für den Bestand, der in Kontakt mit ihm steht, sämtliche potentiellen Gefahren wie un behandelter Flüssigmist.

Diese für die allgemeine Anwendung formulierten Richtlinien bedürfen unter besonderen Umständen spezieller Modifikationen, z.B. beim Ausbruch anzeigenpflichtiger Tierseuchen, wo staatliche Maßnahmen greifen, im speziellen bei hochstabilen Erregern (z.B. bei Anthrax Sporen und einigen Parasiten), beim Überlandtransport von Flüssigmist von Betrieben mit Flüssigmist-Überproduktion zu Gebieten mit einem Bedarf an organischen Düngemitteln.

VIREN IM ABLAUF VON SCHLACHTANLAGEN

In zentralen Schlachstanlagen werden im Normalfall nur klinisch gesunde Tiere für den menschlichen Verzehr geschlachtet. Die im Fleischhygienege setz vom 24.02.1987 vorgeschriebene Lebendbeschau der Schlacht tiere am Tage des Eintreffens im Schlachtbetrieb sowie unmittelbar vor der Schlachtung lässt Tiere mit klinischen Krankheitssymptomen nicht zur Schlachtung kommen. Es besteht aber die Möglichkeit, daß Tiere mit symptomlosen oder symptomatisch nur wenig ausgeprägten Viruserkrankungen bei der Lebendbeschau nicht erkannt werden und so in den Schlachtungsprozeß gelangen. Durch diese zum Zeitpunkt der Schlachtung oftmals potenten Virusquellen können die Schlachtabfälle mit Viren kontaminiert werden. Aus diesem Grund ist in den Schlachthofabwässern möglicherweise eine vergleichbare Palette von Virusarten vorhanden wie im Flüssigmist.

Kranke Tiere werden in Isolierschlachträumen geschlachtet, wobei das Schlachtabwasser gesondert gesammelt und behandelt wird. Alle festen Schlachtabfälle bzw. Blut aus Gesund- und Krankschlachtungen werden als Konfiskate der Tierkörperverwertung bzw. der Verarbeitung in Blutmehlfabriken zugeführt. In diese Verarbeitungsprozesse sind bestimmte anerkannte Sterilisationsverfahren (Erhitzen) eingeschaltet, die bei sachgerechter Handhabung gewährleisten, daß aus seuchenhygienischer Sicht von den entstehenden Produkten (z.B. Tierkörpermehl, Tierfette, Blutmehl, Knochenmehl) keine Gefahr ausgeht.

Die gesamten Abwässer einer Schlachstanlage (Waschwasser für die Schlachtkörper, Einrichtungen der Schlachstanlage sowie Warteställe, Brühwasser) vermischt mit unterschiedlichen Körperflüssigkeiten werden in der Regel nach ei-

ner Abtrennung von Feststoffen der Kanalisation zugeleitet und gelangen in die Kläranlage.

Zum Vorkommen von Viren in Abwässern von Schlachtanlagen konnte lediglich eine Literaturstelle ermittelt werden. Malherbe et al. [7] untersuchte Abwässer einer großen Schlachtanlage in Johannesburg auf natürlich vorkommende Viren. Es konnten Enter-, Reo- und Adenoviren isoliert werden. Die meisten Virusisolale stammten aus Waschwässern für den Intestinaltrakt von Rindern und Schafen. Aus kalten Waschwässern für die Schlachthofeinrichtung konnten nur sporadisch, aus heißen Waschwässern nie Viren isoliert werden.

Die Frage der Eliminierung in Schlachthofabwässern vorkommender Viren bei den Behandlungsprozessen in kommunalen Kläranlagen ist bislang noch nicht untersucht worden und kann deshalb höchstens durch Querverbindungen und Analogieschlüsse beantwortet werden.

In der derzeit geltenden Klärschlammverordnung sind Verfahren genannt, die seuchenhygienisch bedenklichen Klärschlamm in ein seuchenhygienisch unbedenkliches Produkt überführen können. Im einzelnen sind dies physikalische, biologische und chemische Verfahren, die in der Lage sind, im Klärschlamm enthaltene Bakterien, Viren und Parasiten teilweise oder ganz zu eliminieren. Daß bei sachgemäßer Prozeßführung dieser Verfahren auch eine Inaktivierung von Viren zu erwarten ist, haben umfangreiche eigene Untersuchungen erwiesen [15, 16, 2].

Weiter verweise ich auf den Vortrag von Prof. Wyler, der sich speziell mit diesen Fragestellungen beschäftigt. Ausgehend von eigenen Untersuchungen besteht Grund zur Annahme, daß auch tierische Virusarten, die über Schlachthofabwässer in die kommunalen Kläranlagen gelangen, durch definierte Klärschlammementseuchungsverfahren eliminiert werden. Für besonders stabile Virusarten, wie z.B. die Parvoviren, müssen hier allerdings deutliche Abstriche gemacht werden. In eigenen Untersuchungen [15, 16, 11] hat sich gezeigt, daß gerade diese Virusart in bestimmten Fällen Klärschlammbehandlungsverfahren (Pasteurisierung, anaerob-mesophile bzw. anaerob-thermophile Stabilisierung) überstehen kann. Inwieweit biologisch gereinigte Abwässer zu einer Belastung der Vorfluter mit tierischen Virusarten führt und welche gesundheitlichen Risiken daraus erwachsen, kann auf der Basis derzeitiger Kenntnisse nicht endgültig beurteilt werden.

LITERATUR

1. Derbyshire, J.B.: Viral pollution of animal wastes. In: Mahdy, M.S. and Dutka, B.J. (Eds.), *Viruses in the environmental and their potential hazard*. Canada Centre for Inland Waters, P.O. Box 5050, Burlington, Ontario L7R4A6 (1973), 295 - 302

2. Gehring, H.: Vorkommen und Tenazität von Enteroviren in Schlämmen aus Kläranlagen ohne und mit Entseuchungsverfahren. Agr. wiss. Diss., Univ. Hohenheim, 1987
3. Hanks, Th.G.: zit. nach Strauch, 1987
4. Koch, K.M.A.: Hygienisch-virologische Untersuchungen bei der Kalkkonditionierung von Klärschlamm. Forum Städte-Hygiene 33 (1982), 117 - 119
5. Mack, K., Wekerle, J., und Strauch, D.: Vorläufige Mitteilung über die Isolierung von Aujeszky-Virus aus Fest- und Flüssigmist von Schweinen sowie aus Stallluft. Tierärztl. Umschau, 41, 1 (1986), 32 - 38
6. Mahnel, H.: Virusbedingte Risiken bei Tränk- und Brauchwasser und Vorschläge für Standards. Deutsche Tierärztl. Wochenschrift, 93, 7 (1986), 292 - 294
7. Malherbe, H.H., Strickland-Cholmey, M., und Geyer, S.M.: Viruses in abattoir effluents. In: Transmission of Viruses by the Water Route. G. Berg (Ed., Interscience Publishers, New-York - London - Sydney (1965), 347 - 354
8. Mayr, A.: Belebte Krankheitsursachen. In: Frei, W., Allgemeine Pathologie, Verlag P. Parey, Berlin 1971
9. Mayr, A.: Wasser als Vektor von Infektionserregern: Viren im Wasser. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 172 (1980), 237 - 254
10. Rolle, M., und Mayr, A.: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre 5. Auflage. Verlag F. Enke, Stuttgart, 1984
11. Saier, M., Koch, K., und Wekerle, J.: Influence of thermophilic anaerobic digestion (55°C) and subsequent mesophilic digestion of sludge on the survival of viruses without and with pasteurisation of the digested sludge. In: Inactivation of Microorganisms in Sewage Sludge by stabilization processes; ed. by Strauch, D., Havelaar, A.H., L'Hermite, P. Elsevier Appl. Science Publ., London, New York (1985)
12. Sellers, R.F.: Absolute safety. In: Loc. cit. Walton, J.R., and White, E.G., (1981), 239 - 250. (zit. nach Strauch, 1987)

13. Strauch, D.: Hygiene of Animal Waste Management. In: Series World Animals Sciences, Vol. B 6. D. Strauch (Ed.), Animal Production and Environmental Health, pp. 155 - 202. Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1987
14. Strauch, D.: Krankheitserreger in Fäkalien und ihre epidemiologische Bedeutung. Tierärztl. Praxis Suppl. 3, (1988), 21 - 27
15. Wekerle, J., Saier, M., und Strauch, D.: Thermoaktivierung von Viren im Klärschlamm. Forum Städte Hygiene 38 (1987a), 44 - 46
16. Wekerle, J., Leuze, M., Koch, K.M.A., und Strauch, D.: Untersuchungen zum Verhalten von Viren bei der konventionellen und der 2-stufigen anaerob-mesophilen Klärschlammstabilisierung mit Vor- und Nachpasteurisierung. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, 148 (1987b), 214 - 228

Tab. 1: Möglichkeiten der Erregerausscheidung durch infizierte Organismen [nach Mayer, 1971]

Gruppe	Art der Ausscheidung über
Direkte Ausscheidung	Nasen- und Rachensekrete Kot, Urin Augensekret Milch Scheidensekret Nachgeburt- und Lochialsekret Sperma Haut- und Schleimhautveränderungen
Indirekte Ausscheidung	Blut im Stadium der Bakterämie Sepsis und Virämie Kadaver Schlachtplprodukte und Abfälle

Tab. 2: Vorkommen tierischer Virusarten in Fäces, Sekreten und Exkreten
 [aus Strauch, 1988; nach Sellers, 1981, modifiziert]

Fäces als Hauptquelle von ausgeschiedenem Virus	Virus hochtitrig auch vorkommend in:
Enterovirus Reovirus Rotavirus Bovine Virusdiarrhoe Transmissible Gastroenteritis Coronavirus (Kälberdurchfall) Rinderpest Parvovirus Adenovirus	Respiratorische Sekrete Respiratorische Sekrete
Virus in großen Mengen in Fäces vorkommend	Maximale Virusmenge in:
Aujeszky'sche Krankheit Maul- und Klauenseuche Vesikuläre Schweinekrankheit Coxsackievirus Schweinepest Afrikanische Schweinepest	Nasale und pharyngeale Sekrete Vesikuläres Epithel Vesikuläres Epithel Blut Blut
Virus möglicherweise in Fäces vorkommend	
Vesikulärerexanthem des Schweines Rift-Valley-Fieber	Vesikuläres Epithel Blut

Tab. 3: Übersicht über die von landwirtschaftlichen Tierbeständen Nordamerikas ausgeschiedenen Virusarten
[nach Derbyshire, 1973]

Tierart	Unbehüllte Virusarten	Behüllte Virusarten
Rinder	bovinus Enterovirus bovinus Adenovirus Reovirus Reovirus-like bovinus Parvovirus bovinus Rhinovirus bovinus Papillomavirus	IBR-Virus bösertiges Katarrhafieber bovine Virusdiarrhoe bovinus Coronavirus Parainfluenzavirus Typ 3 Tollwut RS (Respiratory-Syncytial) Virus Kuhpocken Paravaccinia vesiculäre Stomatitis
Schweine	porcine Enteroviren procine Adenoviren Reoviren procines Parvovirus	Aujeszky-Virus Einschlußkörperchenkrankheit Schweineinfluenza TGE Schweinepest Schweinepocken
Schafe	ovine Enteroviren ovine Adenoviren Reoviren Bluetongue-Virus Scrapie	Ecthyma Contagiosum Visna/Maedi bösertiges Katarrhafieber Parainfluenza Typ 3
Geflügel	Geflügel-Enteroviren Geflügel-Adenoviren Geflügel-Reoviren	Atypische Geflügelpest (= Newcastle Disease) Geflügelnfluenza infektiöse Laryngotraheitis Geflügelleukose Marek'sche Krankheit Fowlpox Arthritis

Tab. 4: Aujeszky-Virus in tierischen Abgängen bzw. Stallluft infizierter Bestände
[Mack et al., 1986]

Probenmaterial	insgesamt	Pr o b e n z a h l mit CPE auf Zellkultur	ohne CPE auf Zellkultur	immunfluo- reszenz serologisch positiv
Gülle	68	46	22	42
Kot	22	21	1	20
Stallluft (Elektro- präzipitator)	42	29	13	30
Stallluft (Spezial- impinger)	47	38	9	35

Tab. 5: Maximale Virustiter in Fäces
[log ID₅₀ je Gramm; Sellers, 1981]

Virus	Rind	Schaf	Schwein
MKS	5,5	2,7	2,9
SVD	-	-	5,7
Afrik. Schweinepest	-	-	6,0
Rinderpest	6,0	-	-

Tab. 6: Stabilität verschiedener unbehüllter viraler Krankheitserreger gegenüber chemischen, physikalischen und biologischen Einflüssen (nach zahlreichen Literaturangaben)

Virusfamilie und Krankheit	Art der Virusexposition	Zeitdauer nachzuweisender Aktivität bzw. Tenazität
Picornaviridae Maul- und Kluvenseuche	bei normaler Umgebungstemperatur im Stall: in feuchtem Stallschmutz in trockenem Stallschmutz in Jauche in Festmist im Stapel, 30 cm Tiefe in Festmist an der Oberfläche im Sommer in Festmist an der Oberfläche im Winter in angetrocknetem Zustand: an Rinderhaaren an Futtersäcken in Heu bei hoher RH der Luft bei niederer RH der Luft in Gewebematerial (Epithelfetzen, Aphthendecken, Organen) in saurem Milieu: pH 4 pH 5 - 6	10 - 12 Tage 8 Tage 14 Tage bis zu 39 Tage 6 Tage bis zu 28 Tage 67 Tage 4 Wochen 1 - 20 Wochen 5 Wochen 15 Wochen hohe Tenazität Sekunden Verlust von 90% der Infektiosität nach 1 - 2 Min.
Ansteckende Schweineläuse	in faulendem Milieu bei Sonnenstrahlung	25 Tage 2 Stunden
Vesikuläre Schweinekrankheit (SVD)	pH-Wert 2,0 - 10,8 in Jauche bei 5 °C in Transportwagen, auch nach Reinigung in Stallungen in Stallmist	stabil 40 Tage mehrere Tage bis zu 8 Wochen bis zu 12 Wochen
Parvoviridae zumeist klinisch inapparente Infektionen bei einer Anzahl von Tierarten	bei 56 °C bei 80 °C, in Wasser	60 min stabil nach 60 min Reduktion um 4 log
Reoviridae div. Rotavirusinfektionen	bei 56 °C pH 3 in der Umwelt bei 20 °C	60 min stabil 60 min stabil sehr stabil 7 - 20 Monate

Tab. 7: Stabilität verschiedener behüllter viraler Krankheitserreger gegenüber chemischen, physikalischen und biologischen Einflüssen (nach zahlreichen Literaturangaben)

Virusfamilie und Krankheit	Art der Virusexposition	Zeitdauer nachzuweisender Aktivität bzw. Tenazität
Togaviridae Schweinepest	bei pH 3,0 bei 60 °C nach Eintrocknung getrocknetes Augensekret Hautgeschabstel in getrocknetem Harn in getrocknetem virushaltigem Blut in Kot in Harn in faulendem Blut in faulendem Kot und Harn	labil, 30 min je nach Virulenz 5 bzw. 10-20 min sehr stabil 13 - 15 Tage 8 - 9 Tage 2 Tage 138 Tage 7 Tage 5 Tage 3 - 4 Tage 1 - 2 Tage
Herpesviridae Aujeszkysche Krankheit	bei pH 4,5 - 11 in Erde, Schmutz oder Futterbestandteilen bei 15 - 25 °C bei 8 °C im Winter in Schweinegalle, je nach Konzentration in Stapelmist	stabil 30 Tage 32 - 46 Tage 50 Tage 10 Tage - 4 Monate 1 Woche
Infektiöse Laryngo-tracheitis (ILT)	bei 55 °C im Tracheaexsudat bei Zimmer- oder Stalltemperatur	10 - 15 Min. 100 Tage, allmähliche Abnahme der Infektiosität
Infektiöse bovine Rhinotracheitis/infektiöse pustulöse Vulvovaginitis des Rindes (IBR-IPV)	pH 5 - 9 bei 4 °C im Sonnenlicht außerhalb des Tierkörpers u.U.	stabil 48 Stunden wochen- bis monatelang
Paramyxoviridae Newcastle-Disease	bei pH 4 - 11 Tageslicht und UV-Bestrahlung an kontaminierten Flächen des Stalles: bei 5 - 19 °C am Erdboden im Hühnerkot: bei 14 - 21 °C und 54 - 56 % RH bei -2 - 10 °C und 58 - 85 % RH in gestapeltem Hühnermist in vergrubenen Hühnerkadavern	stabil empfindlich bis zu 156 Tage 65 Tage 65 Tage 140 Tage bis zu 20 Tage 121 Tage
Coronaviridae Übertragbare Gastroenteritis (TGE, Schwein)	bei pH 4,0 - 8,0 bei Zimmertemperatur bei 37 °C bei 56 °C im Sonnenlicht	stabil 3 Tage 24 Tage 90 Min. 6 Stunden

Tab. 8: Zoonoseviren, die vom Tier in das Wasser gelangen können
[Mayr, 1980]

Virusart	Widerstandsfähigkeit in Wasser	
	relativ stabil	relativ labil
Coxsackie	x	
Vesicular Disease (Schw.)	x	
Vesicularexanthem (Schw.)	x	
Maul- und Klauenseuche		x
REO 1 bis 3	x	
Rota	x	
Influenza A (Pfd., Schw., Gefl.)	x	
Parainfluenza	x	
Newcastle Disease	x	
Stomatitis Papulsa	x	
Ecthyma	x	
Rhabdo (Marburg, Ebola)		x
Stomatitis Vescularis		x
Pseudowut		x
Corona		x
Arena (LCM, Machupo, Junin, Lassa)		x

Tab. 9: Virale Risikofaktoren bei Tränk- und Brauchwasser [Mannet, 1986]

Tierart	Virusart	Virusaus-scheidung	Vorkommen in Oberflw.	MID etwa	Risiko
		Tränkw.			
Pferd	-	-	-	-	-
	MKS	+++	-	-	-
	Rota (Kalb)	+++	+b	1	0
	MD-BVD	++	-	100	+
Rind	IBR	+	-	10	0
	Vesikulärkrankheit	-	-	0	0
	MKS	+++	+s	1	+
	Rota (Ferkel)	+++	+s	1	0
Schwein	Europ. Schweinepest	++	++	100	+
	TGE	+++	-	10	0
	Parvovirose	+++	+b	1	+
	Aujeszky	++	-	100	0
Geflügel	NDV	++	+b	10	+
	Staupe	++	-	10	0
	Corona-Diarrhoe	+++	-	10	0
	Parvovirose	+++	-	1	0
Hund	HCC	++	-	10	0
	FIP	+	-	?	0
	Panleukopenie	+++	-	1	0
			+s		

b = gilt für Brunnenwasser
 s = in Seuchengebieten

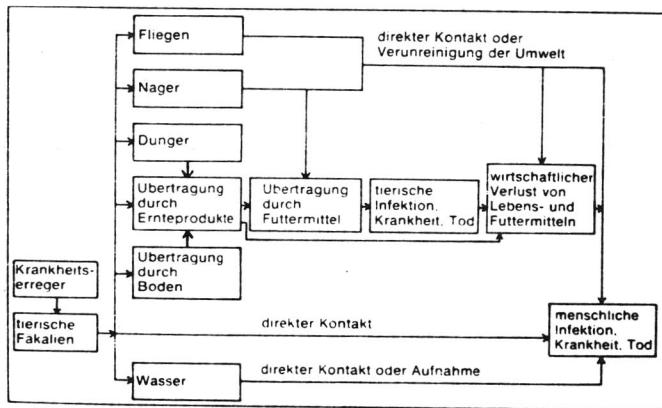


Abb. 1: Beziehungen zwischen tierischen Abfällen und Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier [13, 3]

Diskussion II

Timmis: Welche Mittel wurden verwendet um Kontaminationen bei der Schlachtung der Fische zu vermeiden, welche Kontrollversuche wurden gemacht, um zu vermeiden, daß das Fischfleisch nicht mit den Sezierinstrumenten kontaminiert wurde?

Fattal: Wir haben den Kontaminationsgefahren sehr viel Aufmerksamkeit geschenkt. Wir sind zuversichtlich, daß die Kautelen, die wir für die Isolierung der Keime angewandt haben, ausreichend gewesen sind.

Klein: Herr Wekerle, sie haben uns den Transfer von pathogenen oder nicht pathogenen Viren aus der Viehhaltung in das Abwasser dargestellt. Sie haben zu den vielfältigen Denkansätzen, die wir in bezug auf die Bewertung von Gülle und Flüssigmist haben, einen weiteren hinzugefügt. Mich hat etwas gewundert, mit welcher Gelassenheit Sie die Formulierung einer Regelung vortragen, die auf dem Niveau der Gülleverordnung die Speicherkapazitäten festlegt. Überschußbeseitigung kontaminiert heute schon das Grundwasser und Oberflächenwasser mit allen möglichen konventionellen Stoffen. Dazu kommt die Virusproblematik, über deren Beherrschbarkeit wir im abwassertechnischen Bereich sehr wenig sagen können. Ich hätte auch gerne gewußt, ob es Denkansätze in Ihren veterinär-virologischen Zirkeln gibt, die etwas klarere Impulse dahingehend geben, daß das Abwasserproblem der Tierhaltung wie ein Abwasserproblem aus anderen problematischen Bereichen gehandhabt wird.

Wekerle: Die Informationen, die ich über die Stabilität von Virusarten in tierischen Abfällen dargestellt habe, sind teilweise, besonders hinsichtlich des Schweinepestvirus, sehr alt; sie sind in den Jahren 1930 - 1935 entstanden. Es muß sicher mit aktuellen virologischen Techniken, die aus der Klärschlammtechnik bekannt sind, noch einmal überprüft werden, inwieweit die Zeiten, die dort angegeben sind, auf die heutigen Gegebenheiten übertragbar sind. Zu jener Zeit wurden die landwirtschaftlichen Viehbestände weniger über flüssigen Mist, sondern mehr über festen Mist und Jauche getrennt entsorgt. Im Festmiststapel kam es dann zu einer Erhitzung und somit zur Zerstörung der Viruspartikel. Ich gebe Ihnen recht, daß das Problem der landwirtschaftlichen Abwässer, wie Sie es nennen - ich nenne es das Problem der tierischen festen und flüssigen landwirtschaftlichen Abgänge -, vielleicht auf das Niveau des Problems der Abwasserbehandlung aus dem kommunalen Bereich erhoben werden muß. Doch es fehlen einfach Informationen über die tatsächliche Krankheitsgefahr durch die Verbreitung von Viren aus landwirtschaftlichen Funktionsstätten. Bis zum tierischen Abfall wurden die Verbreitungswege nachvollzogen. Doch wie danach in der Umwelt eine Verbreitung tierischer Viren abläuft, ist bislang kaum bekannt.

Seeber: Wir müssen schon davon ausgehen, daß das hygienische Risikopotential tierischer Abgänge mit demjenigen aus menschlichen Abgängen gleichzusetzen ist, wenn es nicht sogar - vom Erregerspektrum her betrachtet - noch größer anzusetzen ist. Die Vorstellung, daß die Kläranlagen, sofern sie existieren, effizient sind, ist eigentlich nur eine Vorstellung des Laien. Der Durchbruch von Mikroorganismen in funktionierenden Kläranlagen ist proportional dem Eintrag. Also: je höher der Input an mikrobiologischen Konzentrationen, um so höher ist der Output, der dann in den Vorfluter gelangt. Dieser Vorfluter ist ein großer Pool, von dem die Verbreitung ausgeht. Er speist auch offene Badegewässer, die als Freizeitangebot immer mehr genutzt werden. Seit 10 Jahren haben wir eine EG-Richtlinie für die hygienische Beschaffenheit von Badegewässern, die allerdings kaum angewendet wird. Hier sind zum ersten Mal Darmviren in die Begriffsdefinitionen aufgenommen worden, und es sollen in zehn Litern Oberflächenwasser keine Viren nachweisbar sein. Diese Forderung dürfte nur in sehr wenigen Fällen erfüllt werden. Eine weitere Gefahr sehe ich in den Abwässern der Schlachthöfe und in der unkontrollierten Gülleinleitung in die Oberflächengewässer.

Wekerle: Sicherlich müssen Gefahren, die von tierischen landwirtschaftlichen Abfällen ausgehen, höher bewertet werden als bisher. Hinsichtlich der Effizienz von Kärschlammbehandlungsverfahren kann ich Ihnen allerdings nach eigenen Versuchen nur teilweise recht geben. In der Klärschlammverordnung, die seit 1. Januar letzten Jahres in Kraft ist, wird vorgeschrieben, daß auf landwirtschaftliche Nutzflächen nur hygienisch unbedenkliche Klärschlämme aufgebracht werden dürfen. Wie der Begriff "seuchenhygienisch unbedenklich" zu interpretieren ist, wird derzeit in Hohenheim diskutiert. In der Klärschlammverordnung sind chemische und physikalische Verfahren genannt, die tatsächlich zu einer Inaktivierung von Viren bei richtiger Prozeßführung führen können. Wir haben in den letzten 2 1/2 Jahren ein umfangreiches Forschungsvorhaben durchgeführt, in dem wir exemplarisch Klärschlammbehandlungsverfahren untersucht und die Effizienz dieser Verfahren hinsichtlich der Reduktion bakterieller und viral er Krankheitserreger geprüft haben. Es hat sich gezeigt, daß es bei korrekter Durchführung dieser Schlammbehandlungsverfahren zu einer merklichen Reduktion der Keimgehalte kommen kann.

Elimination von Viren im Rahmen der Abwasserklärung, bei der weitergehenden Abwasserrreinigung und in naturnahen Kläranlagen

J. M. Lopez Pila und B. Warnecke

Wie man aus der Epidemiologie von bakteriellen Erkrankungen (Salmonellosen, Shigellosen, Cholera, etc.) bereits seit vielen Jahren weiß, kann das Wasser als Vehikel für zahlreiche Krankheitserreger fungieren. Dabei werden solche Erreger übertragen, die mit den Ausscheidungen von Mensch und Tier in ausreichenden Mengen in das Abwasser gelangen und von dort aus ihren Weg bis zu einem neuen Wirt finden.

Mittlerweile kennt man ca. 120 humanpathogene Virusarten, die mit dem Stuhl oder mit dem Urin ausgeschieden werden und im Abwasser zu finden sind. Außer den Hepatitisviren, von denen mehrere Arten vorkommen (Hepatitis A Viren, Non-A, Non-B Hepatitis Viren), findet man im Abwasser die große Gruppe der Enteroviren, mit 71 Serotypen, die Norwalk und Norwalk-ähnlichen Viren, die Rotaviren, die sogenannten enteralen Adenoviren und andere mehr [15].

Entsprechende wasserübertragene Epidemien von Viruserkrankungen sind beobachtet und beschrieben worden. Als eine der größten solcher Epidemien gilt die Hepatitisepidemie in New Delhi 1955/56. Dabei gab es zwischen 20.000 und 30.000 Erkrankungen, was einer Inzidenz von ca. 2 % der Bevölkerung entsprach. Die Ursache der Epidemie war eine fäkale Kontamination des Flusses, aus dem das Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung entnommen wurde [13]. Obwohl die Gefahren für das Trinkwasser schnell erkannt und hohe Dosen von Chlor angewandt wurden, kam es trotzdem zum Ausbruch der Epidemie. Bakterielle Erkrankungen wurden nicht beobachtet. Diese Tatsache illustriert die Folge der im Vergleich zu Bakterien höheren Desinfektionsmittelresistenz von Viren.

Es herrscht allgemein Übereinstimmung darüber, daß die Elimination oder Reduktion der Viren möglichst in den Abwasserkläranlagen stattzufinden hat und nicht erst eine Aufgabe der Trinkwasseraufbereitung sein sollte. Dieses Prinzip einer frühen wirksamen Inaktivierung wird den Anforderungen der Vorsorge gerecht und verringert darüberhinaus die seuchenhygienischen Gefahren von Oberflächengewässern.

Wie wirksam werden in der Abwasserklärung Viren reduziert? Naturgemäß lassen sich keine genauen Zahlen angeben, da die Zuflüsse zu Kläranlagen sehr heterogen sind und die Elimination von Viren von der Gesamtbelastung der Kläranlage abhängt. Trotzdem liegen Untersuchungen vor, die eine zuverlässige Einschätzung der Reduktionsleistung erlauben. Eine Übersicht findet man bei Berg [3]. Solche Untersuchungen wurden danach von Saffermann und Morris [16], Rao et al., [14] und Irving und Smith [10] durchgeführt. Untersuchungen am Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene in zwei Berliner Kläranlagen ergaben Reduktionsleistungen von ca. 97 bis 99% [2] (Tab. 1). Diese Zahlen sind in guter Übereinstimmung mit der Literatur. Die Reduktion von humanpathogenen Viren in Kläranlagen ist demnach in der Größenordnung mit derjenigen von Bakterien vergleichbar.

In der letzten Zeit ist die Errichtung von sogenannten naturnahen Kläranlagen sprunghaft gestiegen. Darunter versteht man Kläranlagen, meistens in ländlichen Gebieten, die mit einem Minimum an technischem Beiwerk auskommen. Unter ihnen befinden sich häufig die sogenannten Wurzelraumanlagen. Der Klärprozeß soll in ihnen dadurch stattfinden, daß das Abwasser durch den mit den Pflanzenwurzeln durchsäten Bodenkörper geführt wird.

Das Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene hat sich eingehend mit der Klärleistung dieser Anlagen beschäftigt. Das Funktionsprinzip von Wurzelraumanlagen z.B. wird angegeben mit der Filtrationsleistung des Bodens bzw. mit der Reinigungsleistung der dort angesiedelten Mikroorganismen. Angesichts dieses Wirkungsprinzips bestand die Erwartung einer hohen Reduktion bzw. einer vollständigen Elimination von Viren, denn andere bereits abgeschlossene Untersuchungen (siehe Vortrag von H. Dizer) hatten eine hohe Bindungskapazität von Sand und Boden gegenüber Viren offenbart. Um so überraschender war das Ergebnis, daß lediglich ca. 80 - 90% der Viren reduziert wurden.

Ohne hier auf die Ursache dieser eher bescheidenen Leistung weiter einzugehen läßt sich verallgemeinern, daß sowohl in konventionellen als auch in sogenannten naturnahen Kläranlagen höchstens mit einer Reduktion der Viren von zwei Zehnerpotenzen zu rechnen ist. In der Regel wird sicherlich eine schlechtere Leistung zu erwarten sein.

Es gibt mehrere Aspekte, die zu einer kritischen Einstellung gegenüber der Virenfracht in geklärtem Abwasser führen bzw. die in konventionellen Kläranlagen erreichbaren Reduktionsleistungen als unzureichend erscheinen lassen. Diese Bedenken bestehen weniger hinsichtlich einer seuchenhygienischen Gefährdung des Trinkwassers als im Hinblick auf freie Badegewässer. Bekanntlich werden zahlreiche, als Bade- und Erholungsgewässer benutzte Gewässer gleichzeitig als Vorfluter für Kläranlagen beansprucht. Von einer Gefährdung von Badenden muß ausgegangen werden, obwohl in Mitteleuropa in der letzten Zeit von keinem spektakulären Ausbruch einer viralen Erkrankung als Folge des Badens berichtet worden ist. Untersuchungen in den USA an Freiwilligen haben den Verdacht bestätigt, daß die für eine Infektion erforderliche Virenmenge relativ gering

ist. Knight et al. [12] fanden, daß 6 virale Einheiten genügen, um mit einer Chance von 50% eine Coxsackie A-Virus-Infektion zu verursachen. Für Rhinovirus, Typ 15, kam man sogar mit 0,03 Einheiten (nicht zu verwechseln mit physikalischen Partikeln!) aus. Diese Zahlen sind um mehrere Zehnerpotenzen geringer als die Anzahl von z.B. Salmonellen, die für eine Infektion als notwendig geschätzt werden. Ein anderer Aspekt, der eine erhöhte Gefährdung durch Viren nahelegt, ist ihre erhebliche Tenazität, wenn sie gegen UV-Licht geschützt sind. Wir haben gefunden, daß Enteroviren nach über 200 Tagen Inkubation unter Grundwasserbedingungen nicht restlos inaktiviert wurden [8].

Das Fehlen offenkundiger Epidemien von enteroviralen Erkrankungen in Zusammenhang mit dem Baden in freien Gewässern in der Bundesrepublik ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß Infektion nicht mit Erkrankung gleichzusetzen ist. Nur ein Bruchteil der mit einem Enterovirus infizierten Personen entwickelt Krankheitssymptome, im allgemeinen sind es 1 - 2%. Unter diesen Umständen sind massive Epidemien gar nicht zu erwarten, sondern höchstens einzelne Erkrankungen, die als Foci für durch Kontakt weiter entstehender Ketten von Erkrankungen fungieren.

Daß die Oberflächengewässer kaum den Anspruch erheben können, für z.B. Badezwecke hygienisch einwandfrei zu sein, wurde bereits von Carlson 1966 festgestellt [5]. Neun Jahre später, anlässlich einer vom WaBoLu organisierten Tagung über Schwimmbadhygiene stellte Althaus immer noch fest, daß die Wasserverschafflichkeit von Oberflächengewässern aus hygienischer Sicht sich nicht für den Badebetrieb eignete [1].

Als Folge eines verstärkten Umweltbewußtseins wird in Nord- und Mitteleuropa der Bau von Anlagen zur weitergehenden Abwasserreinigung vorwärtsgetrieben, hauptsächlich zum Zweck einer Phosphat-, bzw. Nitratreduktion. Vornehmlich durch Flockung, Fällung und Filtration des bereits mechanisch und biologisch geklärten Abwassers wird eine zusätzliche Reinigung erzielt. Im Laufe der letzten Jahre hat sich das Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene unter anderem darum bemüht, zu bestimmen, wie wirksam solche Anlagen Viren aus dem Wasser entfernen. Drei solcher Anlagen wurden bisher untersucht.

In Zusammenarbeit mit den Berliner Entwässerungswerken wurde die viren-eliminierende Wirkung einer Anlage mit einer Durchflußkapazität von 100 Kubikmeter in der Stunde (Abb. 1) untersucht. Dabei wurden zahlreiche Untersuchungen sowohl mit Polio- als auch mit Rotaviren durchgeführt [11]. Tabelle 2 gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse wieder (Tabelle WAR). Man kann feststellen, daß bereits ohne Desinfektion mindestens 99% der Viren inaktiviert oder entfernt werden. Nach Desinfektion (in diesem Fall Ozonung) waren keine Viren mehr nachweisbar.

Keine so guten Ergebnisse sind zu erzielen mit einem anderen Prinzip der weitergehenden Abwasserreinigung, mit dem Prinzip des Aktivtonerdeverfahrens [6], das hauptsächlich zur Entfernung von Phosphat eingesetzt wurde. Auch hier wurde jedoch eine Inaktivierung von ca. 90% erreicht [11].

Schließlich wurde eine Anlage zur Phosphatelimination untersucht, mit einer Kapazität von 100 Kubikmeter pro Stunde. Die Elimination betrug hier ebenfalls ca. 90%.

Die bisherigen Untersuchungen zur zusätzlichen Elimination zeigen, daß durch die weitergehende Abwasserreinigung die Qualität der Oberflächengewässer in virologischer Hinsicht erheblich verbessert werden kann. Die Ausscheidung von Viren kann natürlich nicht verhindert werden, die technischen Möglichkeiten sind jedoch vorhanden, um ihre Emission in die Gewässer wesentlich einzuschränken.

Die virologische Überwachung von Abwasser und Gewässern, entscheidend für die Erfolgskontrolle von entsprechenden Gewässerschutzmaßnahmen, kann nur dann flächendeckend und wirksam durchgeführt werden, wenn die Überwachungsverfahren nicht zu aufwendig sind und sie die analytischen Möglichkeiten in Laboratorien von z.B. Wasserwerken nicht überfordern. Ein brauchbares Indikatorsystem sollte die folgenden Eigenschaften besitzen:

- Der gemessene Indikatorstoff oder -organismus muß repräsentativ sein.
- Das angewandte Verfahren darf nicht zu aufwendig sein.

Der Nachweis von Enteroviren in Wasser mittels Zellkulturen erfordert ein spezialisiertes Laboratorium und ist obendrein mit einer geringen Effizienz behaftet. Bekanntlich beträgt das Verhältnis zwischen anwesenden und in Zellkulturen tatsächlich nachweisbaren Virionen für z.B. Polioviren ca. 1 - 2 zu 100, für andere Enteroviren sogar viel weniger. Es ist darüberhinaus zu beachten, daß nicht jede Zelllinie sich zum Nachweis aller Viren eignet und daß man deswegen mehrere Zelllinien braucht.

Dagegen erscheint der Nachweis von bestimmten Bakteriophagen (Bakterienviren) als Indikatoren von humanpathogenen Viren als ein möglicher Weg eines breit angelegten Monitoring von Viren in Wasser. Bakteriophagen findet man in großen Mengen im Abwasser. Es scheint, daß sie in ihrer Überwiegenden Mehrheit erst in den Abwasserkanälen oder im Klärwerk entstehen. Anscheinend werden sie nicht, oder nur in geringen Mengen mit dem Stuhl ausgeschieden. Die extrakorporale Vermehrung von Bakteriophagen setzt ein großes Fragezeichen hinsichtlich ihres Wertes als Indikatoren von viraler Verunreinigung. Denn bei positiven Befunden wird sich immer die Frage stellen, ob ihr Vorkommen Ausdruck einer viralen Kontamination fäkalen Ursprungs ist oder lediglich einer Phagenvermehrung. Wegen des geringen Aufwandes, der für die Phagenbestimmung getrieben werden muß, sollte ihre Brauchbarkeit als Virenindikatoren weiter untersucht werden.

Das Verfahren der molekularen Hybridisation von DNA bietet eine ausreichende Spezifität und theoretisch auch eine genügende Sensitivität, um den Anforderungen eines Umweltmonitoring zu genügen. Leider sind die Erfahrungen, die man mit diesem Verfahren bisher gewonnen hat, auf Arbeiten in biochemischen oder genetischen Laboratorien beschränkt, die unter definierten Randbe-

dingungen durchgeführt worden sind. Analysen von Umweltproben mit ihrer undefinierten, heterogenen und wechselnden Zusammensetzung (Oberflächenwasser, Schlamm, Boden) fehlen oder die damit gemachten Erfahrungen sind unzureichend.

Die Hybridisierungstechnik von Nukleinsäuren ermöglicht es, spezifische Genabschnitte eines Chromosoms zu identifizieren. Dieses Verfahren wird heute routinemäßig in den molekularbiologischen Laboratorien angewandt, aber auch in der klinischen Virologie sind derzeit eine Reihe von klassischen Nachweismethoden von Viren im Begriff, durch Nukleinsäurehybridisationsverfahren ersetzt zu werden. So können Hepatitis B-Viren [7] Cytomegalie-Viren [17], Afrikanische Schweinefieber-Viren [4] und Picornaviren [9] im Rahmen der klinischen Diagnostik mit Hilfe solcher Verfahren nachgewiesen werden.

Vielles deutet darauf hin, daß dieses Prinzip für das Monitoring von Viren in Gewässern erfolgreich sein könnte. Durch die Wahl einer geeigneten Sonde wäre nämlich theoretisch möglich, auf alle in Frage kommenden Viren gleichzeitig zu untersuchen.

Aus den obigen Ausführungen lassen sich die folgenden Schlußfolgerungen ziehen:

- Die Bestimmung von Enteroviren zwecks Beurteilung der Qualität von Oberflächenwasser ist aufwendig und daher für den Routinebetrieb weniger geeignet.
- Die Eignung von Bakteriophagen als Indikatoren ist umstritten, da Zweifel bestehen, ob sie repräsentativ sind.
- Der Nachweis von Viren mittels der Nukleinsäurehybridisation zwecks Monitoring ist zwar möglich und verspricht eine realisierbare Alternative zu werden. Weitere Erfahrungen sind jedoch erforderlich.
- Die Reduktion von pathogenen Viren in Kläranlagen ist sehr unterschiedlich. Sie beträgt zwischen 90 und 99,5%. Diese Reduktion gilt als nicht ausreichend, um einen virologisch einwandfreien Zustand des Wassers zu gewährleisten.
- Anlagen zur weitergehenden Abwasserreinigung und Entphosphatung sind geeignet, Viren um mindestens eine weitere Größenordnung zu reduzieren und die Wasserqualität seuchenhygienisch erheblich zu verbessern.

LITERATUR

1. Althaus, H., und Bewig, F.: Zur Beurteilung von offenen Gewässern für Badezwecke. Schr.Reihe Ver. WaBoLu, Berlin-Dahlem, Band 43, Stuttgart (1975), 45 - 58
2. Antoniadis, G., Seidel, K., Bartocha, W., und Lopez, J.M.: Virenelimination aus städtischen Abwässern durch biologische Abwasserreinigung. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 176 (1982), 537 - 545

3. Berg, G.: Removal of viruses from sewage, effluents, and waters. Bull. Wld Hlth Org. 49 (1973), 451 - 460
4. Cabellero, R.G., and Tabares, E.: Application of pRPEL2 plasmid to detect african swine fever virus by DNA-DNA hybridisation. Arch. Virol. 87 (1986), 119 - 125
5. Carlson, S.: Zur Hygiene der Freibadegewässer und öffentlichen Schwimm- bäder, Infektionsrisiko. Bundesgesundheitsblatt 9 (1966), 169 - 173
6. Donnert, D., und Eberle, S.H.: Die praktische Erprobung und Optimierung des Aktivtonerieverfahrens zur Nachreinigung von Abwässern. In: Weitergehende Reinigung kommunaler Abwässer, insbesondere zur Phosphatelimination. Hoechst-Symposium im Werk Knapsack, Herausgeber: Fa. Hoechst (1982), 67 - 80
7. Feiwman, S.W., Berris, B., Gaha, A., Sookuannan, R., Bradley, D.W., Bond, W.W., and Maynard, J.E.: DNA-DNA hybridisation method for the diagnosis of hepatitis B infection. J. Virol. Meth. 8 (1984), 199 - 206
8. Filip, Z., Dizer, H., Kaddu-Mulindwa, D., Kiper, M., Lopez Pila, J.M., Milde, G., Nasser, A., und Seidel, K.: Untersuchungen über das Verhalten pathogener und anderer Mikroorganismen und Viren im Grundwasser im Hinblick auf die Bemessung von Wasserschutzzonen. WaBoLu-Hefte, Inst. f. Wass.-, Boden- u. Lufthyg. des BGA H. 3 (1986)
9. Hyypia, T.P., Stahlhandske, P., Vainionpaa, R., and Petterson, V.: Detection of enteroviruses by spot hybridisation. J. Clin. Microbiol. 19 (1984), 436 - 438
10. Irving, L.G., and Smith, F.A.: One-Year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. Appl. Environm. Microbiol. 41 (1981), 51 - 59
11. Ismail, A.B., Lopez Pila, J.M., Altmann, H.J., und Sarfert, F.: Elimination von pathogenen Viren bei der weitergehenden Abwasserreinigung. Gwf Wasser-Abwasser H. 4, 128 (1987), 219 - 225
12. Knight, V., Gilbert, B.E., and Wilson, S.Z.: Airborne transmission of virus infection. In: Fields, B., Martin, M.A., and Kamely, D.: Genetically altered viruses and the environment. Cold Spring Harbour Laboratory, (1985), 73 - 94

13. Melnick, J.L.: A waterborne urban epidemic of hepatitis. In: LoGrippo, G.A., J.G. Mateer, and J. Barron, *Hepatitis Frontiers*. Little, Brown, Boston, (1957), 211 - 225
14. Rao, V.C., Lahke, P.W., Waghmore, S.W., and Dube, P.: Virus removal in activated sludge sewage treatment. *Progr. Water Technol.* 9 (1977), 113 - 127
15. Rao, V.C., and Melnick, J.L.: Environmental Virology. *Aspects of Microbiology* 13. American Society of Microbiology (1986)
16. Saffermann, R.S., and Morris, M.E.: Assessment of virus removal of a multi-stage activated sludge process. *Water Res.* 10 (1976), 413 - 420
17. Spector, S.A., Rua, J.A., Spector, D.H., and McMillan, R.: Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by DNA-DNA hybridisation. *J. Inf. Dis.* 150 (1984), 121 - 126

Tab. 1: Mittelwerte der in den untersuchten Abwasserproben gefundenen Virus-konzentrationen. Zum bequemeren Vergleich sind die Werte auch in Prozent angegeben, wobei die Werte der Rohabwasserproben als 100% gesetzt worden sind [2].

Wahrscheinlichste Anzahl zytopathogener Einheiten/10 l

	Zulauf		Ablauf	
	\bar{M}	%	\bar{M}	%
Ruhleben	4265	100	36	0,85
Marienfelde	5439	100	116	2,1

Tab. 2: Reduktion von Viren in zwei Kläranlagen, nach dem Belebtschlamm-verfahren [11].

	Aktive Viren (%)	
	Rota SA 11	Polio III (Impfstamm)
Einlauf	100	100
Nach Flockung	5 - 10	5
Nach Sandfiltration (reversibel?)	0,5	1
Nach Ozonung	weniger als 0,005	weniger als 0,01

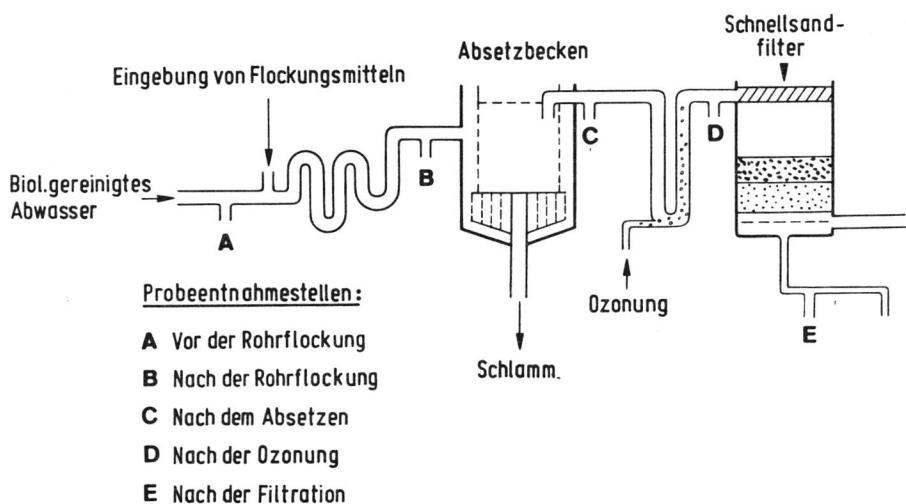


Abb. 1: Skizze der WAR-Anlage Berlin-Ruhleben. Die Beprobungsstellen sind mit den Buchstaben A-E gekennzeichnet [11]

Verfahren zum Nachweis von Enteroviren und Coliphagen in Wasser unterschiedlicher Herkunft

*T. Hahn, M. Karst, D. Tougianidou, K. Herbold,
B. Flehmig und K. Botzenhart*

ZUSAMMENFASSUNG

Unsere Methoden zur Virusauflösung basieren auf der Fällung mit Aluminiumsulfat, Lyse des Aluminiumhydroxids und Ultrazentrifugation des Ly-sats. Diese Methode wurde variiert (u.a. auch Verwendung von $MgCl_2$ als Fällungsmittel) und optimiert. Die Virusauflösung erfolgte aus unterschiedlichen Gewässern (Trinkwasser, Fließ- und Seewasser, Wald- und Karstquellen, Grundwasser). Die Viruskonzentrate wurden auf Zellen zum Nachweis von Enteroviren (primäre Affenierenzellen) bzw. zum Nachweis von Hepatitis-A-Viren (Frhk 4-Zellen) gegeben. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, daß Viren in allen untersuchten Gewässern häufiger zu finden sind, als bisher angenommen. Auf die hohe Resistenz der Viren in Wasser (insbesondere von HAV) weisen die Ergebnisse von Versuchen hin, in denen wir die Abtötung von HAV bzw. Polioviren im Wasser durch Ozon untersuchten.

Der Coliphagnachweis erfolgte aus den oben beschriebenen Gewässern mittels direktem Plaquetest, Fällungsreaktionen mit anschließenden Schritten zur Auflösung und Filterverfahren. Die Verfahren wurden bezüglich ihrer Effektivität verglichen und optimiert. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Wiederfindungsrate in Abhängigkeit vom Verschmutzungsgrad des Wassers. Die Fällungsverfahren erwiesen sich im Vergleich zu den Filtrationsverfahren als weniger störanfällig. Zur Zeit wird an Methoden gearbeitet, mit denen die Inhaltsstoffe des Wassers (z.B. oberflächenaktive Substanzen), die die Effektivität der Filtration beeinflussen, eliminiert werden sollen.

In der Bundesrepublik liegen zwar keine eindeutigen Hinweise dafür vor, daß Trinkwasser wesentlich zur Verbreitung viraler Erkrankungen beiträgt; da jedoch bei uns nach solchen Erkrankungen nicht gezielt gesucht wird und da amerikanische Untersuchungen eine relativ hohe Anzahl wasserübertragener viraler Erkrankungen mit einer hohen Dunkelziffer feststellen konnten [1], könnte es durchaus sein, daß auch bei uns durch Trinkwasser übertragene Viruserkrankungen in größerer Anzahl auftreten, als dies zur Zeit dokumentiert ist.

Auch Untersuchungen aus unserem Institut bestätigen solche Befürchtungen. In verschiedenen Wässern des Tübinger Raumes konnten wir u.a. auf primären Affennierenzellen häufiger enterale Viren finden, als wir dies erwartet hatten - auch Wasser, das nach Aufbereitung in das Leitungssystem als Trinkwasser eingespeist wurde, erwies sich häufig als viruspositiv (Abb. 1).

Diese und zahlreiche weitere Aspekte - wie die Notwendigkeit einer Überwachung des Virusvorkommens von insbesondere schlechtem Rohwasser - führen dazu, nach geeigneten Indikatoren für virale Krankheitserreger im Wasser zu suchen und die Verfahren zum Nachweis von Viren im Wasser zu optimieren.

Da pathogene Viren des Wassers häufig menschlichen Fäkalien entstammen, ist es wichtig, Wasser vor und nach der Aufbereitung auf deren fäkale Verunreinigung zu untersuchen. Abbildung 2 zeigt einige mögliche Indikatoren, die eine fäkale Verunreinigung des Wassers anzeigen könnten.

Aufgrund von - im Gegensatz zu Viren - relativ schnellen, zuverlässigen und wenig aufwendigen Nachweisverfahren kommen aus methodischer Sicht in erster Linie Bakterien und Phagen als Indikatoren für virale Krankheitserreger im Wasser in Frage. Neben den hohen Qualitätsanforderungen an das Nachweisverfahren müssen mögliche Indikatororganismen quantitativ möglichst eng mit dem Vorkommen enteraler Viren im Wasser korrelieren.

Wie schwierig es ist, geeignete Indikatoren für pathogene enterale Viren im Wasser zu finden, zeigen Untersuchungen aus unserem Institut, von denen ich Ihnen einige Ergebnisse vorstellen möchte (Abb. 3). Die Proben wurden dem Neckar und einem Pegelbrunnen eines Kiesgrundwasserleiters entnommen. Der Pegel befand sich in ca. 50 m Entfernung vom Neckar; das Wasser des Aquifers wurde zum größten Teil vom Uferfiltrat des Neckars gebildet (pro Entnahmestelle: 20 Proben). Die Abbildung zeigt, daß im Neckar häufig E. coli und coliforme Keime in 100 ml, enterale Viren in 10 l und immer Coliphagen in 10 l gefunden wurden. Im Grundwasserleiter waren jedoch trotz des wiederholten Nachweises von E. coli und coliformen Keimen in 100 ml und enteralen Viren in 10 l in keinem Fall Coliphagen vorhanden.

Man könnte hieraus schließen, daß bei großer fäkaler Belastung Coliphagen einen Indikator für enterale Viren darstellen könnten, was bei geringerer fäkaler Belastung nicht möglich ist. Es wird wohl insbesondere für fäkal relativ gering belastetes Gewässer schwierig sein, Indikatoren für virale Krankheitserreger im Wasser zu finden.

Unter diesem Aspekt versuchten wir, Anreicherungsverfahren zur Aufkonzentrierung von Coliphagen im Wasser zu optimieren. Weiteres Ziel war es, Anhaltspunkte für eine Verbesserung entsprechender Anreicherungsverfahren von enteralen Viren im Wasser zu erhalten. Wir konnten bei diesem Vorhaben auf die Vorarbeiten zahlreicher Autoren zurückgreifen, siehe u.a. [2 - 6].

Die beiden von uns angewandten Hauptverfahren zur Anreicherung waren die Fällung und die Filtration.

Zunächst zum Prinzip der Fällung: Durch Zugabe von Fällungsmittel in die Wasserprobe, die auf einen bestimmten pH eingestellt ist, werden Flocken gebildet und Partikel im Wasser - u.a. auch Phagen - an amorphe Hydroxiditeilchen adsorbiert und sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das Sediment am Boden des Gefäßes durch Ansäuern wieder aufgelöst und die Partikel - also auch die Phagen - resuspendiert: die Phagen können dann nachgewiesen werden.

Bei allen im folgenden dargestellten Versuchen zur Aufkonzentrierung von Coliphagen wurden als Ausgangslösung Phagen von Proben des Neckars mit einem Titer von 50 - 100 PFU/l verwendet. Unter "Wiederfindungsrate" wird dabei der prozentuale Anteil der Ausbeute an Coliphagen nach Anwendung des Aufkonzentrierungsverfahrens verstanden - im Verhältnis zur Ausbeute einer Kontrolle im Direct Plaque Assay ohne Aufkonzentrierungsverfahren; diese Kontrolle entspricht 100%. Beim Vergleich von Fällungsverfahren mit $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ bzw. MgCl_2 zeigte sich, daß mit MgCl_2 wesentlich höhere Wiederfindungsrationen erzielt werden konnten als mit $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (Abb. 4). Nicht alle Coliphagen sind nach der Fällung im Sediment gebunden, sondern es befinden sich auch noch im Überstand an Flocken adsorbierte Phagen (Abb. 4).

Die von uns verwendete Fällungsmethode mit MgCl_2 stellt sich folgendermaßen dar (Abb. 5): nach Absetzen des Fällungsproduktes wird der Überstand abgesaugt, dann wird das Sediment durch Ansäuerung aufgelöst und die in Lösung gebrachten Phagenpartikel durch den Direct Plaque Assay nach Grabow [7] nachgewiesen. Der letzte Schritt ist wichtig, da mit dieser Methode alle Phagenpartikel des Sediments erfaßt werden - und nicht nur Phagen von einem Bruchteil des Sediments, von dem aus hochgerechnet wird.

Die Fällung kann von Inhaltsstoffen der Wasserproben beeinflußt werden (Abb. 6): wichtig in diesem Zusammenhang sind Tenside und Huminsäuren [4, 8]. Als Ersatz für die Huminsäuren wurde in unseren Versuchen Ligninsulfinsäure eingesetzt; die Tenside und die Ligninsulfinsäure wurden in höheren Konzentrationen zugesetzt, als dies den Konzentrationen in natürlichen Gewässern entspricht. In unseren Versuchen zeigten nur anionische Tenside und Ligninsulfinsäure eine negative Wirkung auf die Wiederfindungsrate; nichtionische Tenside konnten das Ergebnis der Fällung nicht wesentlich beeinflussen. Die Zufügung von Polysacchariden ergab keinen negativen Effekt auf die Wiederfindungsrate (Abb. 6).

Nun zum Verfahren der Filtration - als Beispiel die von uns angewandte Methodik: Durch mehrere hintereinander geschaltete Filter wurde die Probe, die auf pH 7,5 - 8 eingestellt ist, gesaugt. Die Coliphagen werden an die Filter adsorbiert und anschließend durch Zugabe von Elutionsmittel (8% Beefextrakt, 1 M NaCl) bei pH 9 wieder desorbiert. Der Elutionsvorgang wird unterstützt durch kräftiges Schütteln der Filter oder - mit einem größeren Effekt - durch Ultraschallbehandlung. Die in Lösung gebrachten Coliphagen werden mit dem Direct Plaque Assay nach Grabow [7] nachgewiesen - wie schon bei der Fällung dargestellt.

Nach Vorversuchen mit elektropositiven Filtern der Fa. AMF Cuno zeigten sich am effektivsten - mit der höchsten Wiederfindungsrate - Virosorb 1 MDS - Filter. Wir konnten feststellen, daß mit zunehmender Anzahl von hintereinandergeschalteten Filtern die Wiederfindungsrate nach der Elution kontinuierlich zunahm. Insbesondere bei Wasser, das mit die Filtration beeinflussenden Stoffen belastet war, zeigte sich, daß bis zu zwei Dritteln der wiedergefundenen Coliphagen auf den am Ende des Filtrationsvorganges verwendeten Filtern zu finden waren. Aus praktischen und aus Kostengründen entschieden wir uns in den folgenden Versuchen dafür, 3 Filter hintereinander zu schalten.

Das Ausmaß der Adsorption an die Filter, die Höhe der Elutionsrate und der Wiederfindungsrate sind abhängig vom pH der Wasserprobe. Wir fanden mit dem beschriebenen Elutionsmittel und den Virosorb 1 MDS - Filtern im pH-Bereich von 7,5 - 8 die höchsten Wiederfindungsraten (Abb. 7).

Auch bei der Filtration wurde der Einfluß von Wasserinhaltstoffen auf die Höhe der Wiederfindungsrate untersucht. Es wurden die gleichen Stoffe in gleicher Konzentration zugesetzt wie bei den Fällungsversuchen. Bei Ligninsulfinsäure und Polysacchariden zeigten sich die gleichen Effekte wie bei der Fällung: eine starke Reduktion der Wiederfindungsrate bei Zugabe von Ligninsulfinsäure und keine Reduktion der Wiederfindungsrate bei den Polysacchariden - vielleicht sogar eine dispergierende Wirkung der Polysaccharide. Bei den nicht-ionischen Tensiden ergab sich - im Gegensatz zur Fällung - eine deutliche Reduktion der Wiederfindungsrate; bei den anionischen Tensiden lag die Wiederfindungsrate ebenfalls wesentlich niedriger als bei der Fällung (Abb. 8).

Es ist naheliegend, durch die Vorbehandlung der Wasserprobe die die Fällung beeinflussenden Inhaltsstoffe zu entfernen, ohne möglicherweise im Wasser vorhandene Coliphagen zu verlieren.

Wir behandelten die Wasserprobe mit einem einfachen Begasungsverfahren (Luft), das ein Austreiben der Tenside und damit eine erhöhte Wiederfindungsrate bewirkte. Nach Zugabe von Ligninsulfinsäure konnte mit der Begasung kein solcher positiver Effekt erzielt werden. Auch bei Umweltproben von relativ stark verschmutztem Wasser konnte durch die Begasung keine Verbesserung der Wiederfindungsrate erreicht werden (Abb. 8).

Ein Einfluß von Wasserinhaltstoffen ist nicht nur auf den Ablauf der Fällung bzw. der Filtration zu erwarten - sondern auch auf den Ablauf des Pla-

que Assays: So kommt es z.B. bei hochdosierter Zugabe von Tensiden nicht immer zur typischen Ausbildung runder, abgegrenzter Plaques.

Bei der Aufkonzentrierung von Coliphagen aus Wasser ist die $MgCl_2$ -Fällung zumindest gegenüber der Filtrationsmethode, wie wir sie angewandt haben, zu bevorzugen aus folgenden Gründen: 1. die Fällung ist weniger störanfällig; 2. der Plaque Assay bei der Fällung ist sensibler. Wie wir in Versuchen zeigen konnten, werden durch das Vorhandensein des Fällungsproduktes - also amorpher $Mg(OH)_2$ -Partikel - wesentlich mehr Plaques gebildet als in Lösungen, in denen keine solchen Partikel vorkommen - z.B. in der Elutionslösung unseres Filtrationsverfahrens; 3. die Fällung ist kostengünstiger und praktikabler bei Wassermengen bis zu maximal 10 l Wasserprobe. Bei großen Wassermengen (über 10 l) ist die Fällung aus praktischen Gründen kaum mehr durchzuführen; hier wäre die Filtration vor Ort von Vorteil.

Bei der Anreicherung von Viren aus Wasser haben wir uns aus untersuchungstechnischen Gründen für die Fällung entschieden, wobei wir die von Walter und Rüdiger [2] entwickelte Methode übernommen haben.

Beim Vergleich der $MgCl_2$ -Fällung mit der $Al_2(SO_4)_3$ -Fällung zeigte sich, daß bei niedrigen Ausgangstitern von Polioviren in der Wasserprobe die $MgCl_2$ -Fällung besser war - bei höheren Ausgangstitern konnten wir keinen eindeutigen Unterschied feststellen. Bei allen Versuchen bestätigte sich der bekannte Trend, daß mit abnehmendem Ausgangstiter die Wiederfindungsrate sinkt (Abb. 9).

Bei Versuchen mit verschmutztem Fluß- bzw. Seewasser als Ausgangsprobe, die vor Zugabe der Polioviren autoklaviert wurde, bestätigte sich, daß Wasserinhaltsstoffe die Fällung beeinflussen können (Abb. 10).

Neben der im Vergleich zur $Al_2(SO_4)_3$ -Fällung höheren Wiederfindungsrate bei niedrigen Ausgangstitern bringt die $MgCl_2$ -Fällung auch Nachteile mit sich. 1. Es ist meist - insbesondere bei verschmutztem Wasser - eine erheblich größere Menge an Hydroxid aufzulösen und zu verarbeiten als bei der $Al_2(SO_4)_3$ -Fällung, was bei virologischen Untersuchungen einen erheblichen Mehraufwand bedeutet. 2. Die Auflösung des Sediments nach der $MgCl_2$ -Fällung ist bei verschmutztem Wasser schwieriger; es ist notwendig, mehr Pufferlösung zuzugeben.

Als Fazit zu den Aufkonzentrierungsverfahren von Viren aus Wasser läßt sich sagen, daß die Einflußfaktoren verschiedener Inhaltsstoffe des Wassers auf verschiedene zur Verfügung stehende Verfahren noch besser charakterisiert werden müssen und die Methoden dann - auch unter diesem Blickwinkel - standardisiert werden sollten [9].

Wie bereits anfangs erwähnt, konnten wir in verschiedenen Gewässern relativ häufig enterale Viren finden - u.a. auch in Wasser nach einer O_3 -Aufbereitung, das Trinkwasserqualität haben sollte. Es erscheint uns deshalb wichtig, noch kurz einige Ergebnisse vorzustellen, die die Absterberate von Polioviren und Hepatitis-A-Viren untersuchten.

Die Inaktivierungsversuche erfolgten im Zustand eines Fließgleichgewichtes, das sich im Meßgefäß nach einiger Zeit einstellte - für jeden untersuchten Bakterien- oder Virusstamm und jede Ozonkonzentration, die in dem Zulaufwasser des Meßgefäßes eingestellt war, ergaben sich charakteristische Gleichgewichtskurven: Es stellte sich im Gleichgewicht nach einer bestimmten Zeit eine konstante Konzentration von noch nicht inaktivierten Bakterien bzw. Viren und eine konstante Ozonkonzentration ein.

Unter diesen Bedingungen konnten wir finden, daß Polioviren sehr empfindlich auf Ozon reagieren und eine hohe Absterbekonstante aufwiesen. Die vollständige Inaktivierung von Polioviren erfolgt bei einer Ozonkonzentration im Gleichgewicht von 0,13 mg/l (Ozonkonzentration zu Beginn des Versuchs: 0,19 mg/l bei 20 °C) (Abb. 11).

Hepatitis-A-Viren waren dagegen wesentlich ozonresistenter als Polioviren. Eine vollständige Inaktivierung erfolgte erst bei einer Ozonkonzentration im Gleichgewicht von 0,38 mg/l (Ozonkonzentration zu Beginn des Versuchs: 1,22 mg/l bei 20 °C) (Abb. 11).

Die Ozonresistenz von *E. coli* war etwas geringer als die Resistenz des Hepatitis-A-Virus; die Resistenz des Hepatitis-A-Virus war aber wiederum geringer als die Resistenz von *Legionella pneumophila* (Abb. 11).

Interessant war, daß bei einer Versuchstemperatur von 10 °C die Abtötung von Hepatitis-A-Viren schneller erfolgte als bei einer Temperatur von 20 °C (vollständige Abtötung bei einer Ozonkonzentration im Gleichgewicht von 0,27 mg/l bei 10 °C bzw. 0,38 mg/l bei 20 °C). (Abb. 12).

Der Beitrag sollte Ihnen aus der Sicht des Hygienikers und damit der angewandten Wasservirologie zeigen, daß es zahlreiche Fragestellungen in der Wasservirologie gibt, die sich aus der Praxis stellen und noch dringend gelöst werden müssen - wobei die hiervon behandelten Beispiele nur ein Ausschnitt darstellen.

LITERATUR

1. Lippy, E.C., and Walrip, S.C.: Waterborne disease outbreaks - 1946 - 1980: a thirty-five-year Perspective. J. AWWA 76 (1984), 60 - 67
2. Walter, R., und Rüdiger, S.: Ein Zweistufenverfahren zur Virusanreichung aus Lösungen mit geringem Virustiter (z.B. Trinkwasser). J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. (Praha) 25 (1981), 71 - 81
3. Althaus, H., und Jung, K.D.: Feldversuche im mittelsandigen Grundwasserleiter Haltern zur Feststellung der Lebensdauer und des Transportverhaltens von Bakterien und Viren in Grundwasserleitern. Umweltforschungsplan des Bundesministers des Innern. Wasser. Forschungsbericht 102 02 202/10 (1985)

4. Luther, A., Dizer, H., Lopez, J.M.: Einfluß von Tensiden auf die Adsorption von Coliphagen f2 im Boden. 41. DGHM-Tagung Heidelberg. Poster (1987)
5. Schatte, L.: Koliphagen im Trinkwasser - Nachweis und Bedeutung. R. Walther et al. (Hrsg.): Symposium: Viruskontamination der Umwelt und Verfahren der Kontrolle. Dresden (1987), 85 - 89
6. Schulze, E., und Lenk, J.: Concentration of coliphages from drinking water by Mg(OH)₂ flocculation. Naturwissenschaften 70 (1983), 612 - 613
7. Grabow, W.O.K., and Coubrough, P.: Practical direct plaques assay for coliphages in 100 ml samples of drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 52 (1986), 430 - 433
8. Sobsey, M.D., and Hickley, A.R.: Effects of humic and fulvic acids on poliovirus concentration from water by microporous filtration. Appl. Environ. Microbiol. 49 (1985), 259 - 264
9. Report of a WHO scientific group: Human viruses in water, wastewater and soil. WHO Tech. Rep. Ser. 639 (1979)

Herkunft der Wasserprobe	Anzahl der untersuchten Wasserproben	davon positiv auf primären Affenierenzellen	nach....Tage
Kläranlagenabfluß	2	2	8, 11
FluBwasser	6	5	11, 25, 12, 12, 10
Badesee	6	6	49, 82, 82, 88, 19, 38
Waldquelle 1	11	3	63, 68, 24
Waldquelle 2	4	2	49, 88
Waldquelle 3	10	9	29, 63, 63, 88, 88, 88, 92, 92, 92
Karstquelle	10	5	18, 29, 82, 24, 22
Grundwasser	16	9	25, 78, 53, 34, 32, 24, 38, 31, 22
Trinkwasser	12	6	18, 18, 82, 24, 31, 22

Abb. 1: Viruspositive Proben verschiedener Gewässer des Tübinger Raumes (die Viren wurden aus einer Wasserprobe mit einer Al₂(SO₄)₃-Fällung aufkonzentriert; in der rechten Spalte ist für jede Probe die Anzahl der Tage bis zum Auftreten eines cytopathischen Effekts angegeben - jede Zahl steht für eine untersuchte Probe)

Abb. 2:

Suche nach Indikatoren für virale Krankheits-
erreger fäkalen Ursprungs im Wasser - Beispiele

E. coli, coliforme Keime
Enterobakterien
Fäkalstreptokokken
anaerobe Clostridiensporen

Coliphagen

Enteroviren

Wasserproben aus dem Neckar und einem in der Nähe liegenden Grundwasserleiter

	E.coli in 100ml pos. (%)	colif.K. in 100ml pos. (%)	Kol.zahl je ml erhöht (%)	Coliphagen in 10l pos. (%)	viruspos. (CPE) in 10l prim. Affennieren- zellen (%)
Neckar	62	57	100	100	83
Grundwasser- leiter Gehrnfeld (Uferfiltrat Neckar)	44	48	100	0	50

Abb. 3: Untersuchungen von Wasserproben des Neckars ($n = 7$) und einem in der Nähe liegenden Grundwasserleiter ($n = 15$) (Coliphagen: Fällung mit $MgCl_2$ und Direct Plaque Assay nach Grabow [7]; enterale Viren: Fällung mit $Al_2(SO_4)_3$ und CPE auf primären Affennierenzellen)

Wiederfindungsrate bei Fällungen mit $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ und MgCl_2

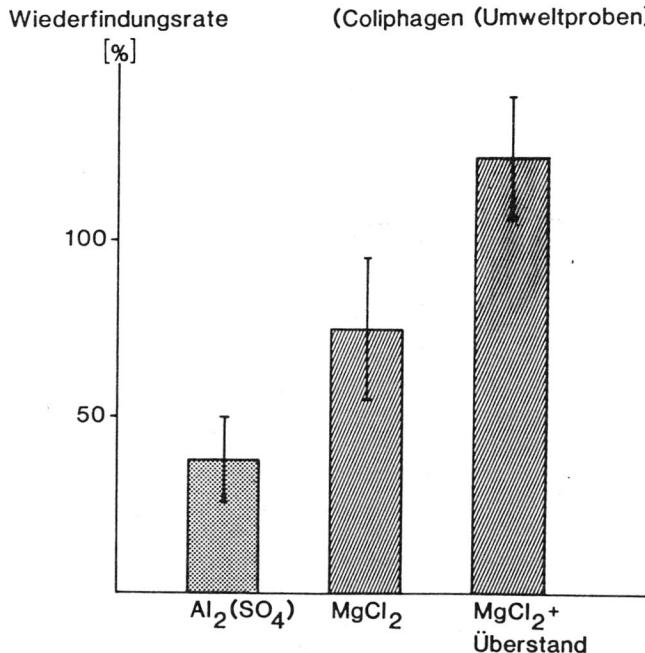


Abb. 4: Fällung mit $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ und MgCl_2 zur Aufkonzentrierung von Coliphagen im Wasser

Abb. 5:

Aufkonzentrierung von Coliphagen aus Wasser - Fällung

- 1 l Wasserprobe: + 10 ml 1m MgCl_2 + 3,5 ml 1m K_2HPO_4
(20 °C) pH auf 9,0 einstellen (2n NaOH)
- 5 min rühren
- 1 h stehen lassen
- Überstand absaugen
- Rest zentrifugieren (5 min/ 3000 U/min)
- Überstand verwerfen
- Pellet lysieren bei pH 4,5-5,0 in:
0,2m Na_2HPO_4 / 1m Zitronensäure
- Direct Plaque Assay (DPA) (nach Grabow 1986)

Fällung - Einflußfaktoren
(MgCl₂ - Coliphagen (Umweltproben))

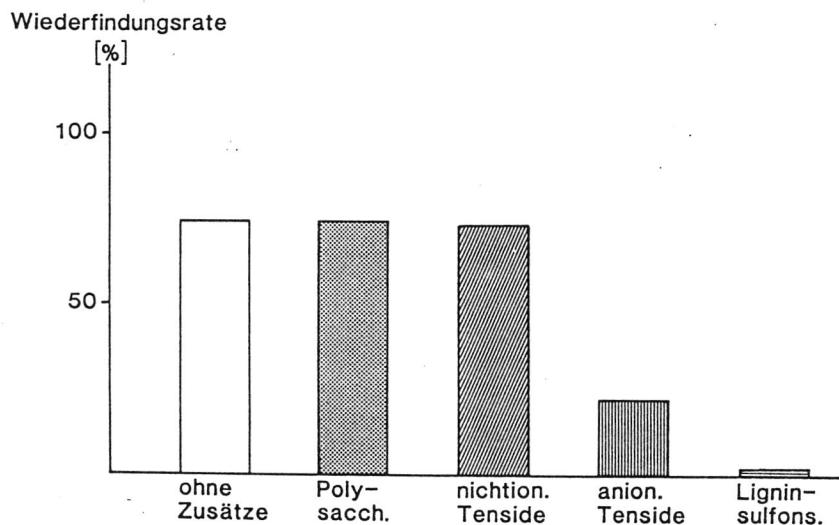


Abb. 6: Inhaltsstoffe des Wassers, die die Fällung beeinflussen können

Einfluß des pH-Wertes auf Adsorption, Elution und Wiederfindungsrate bei der Filtration - (Coliphagen (Umweltproben))

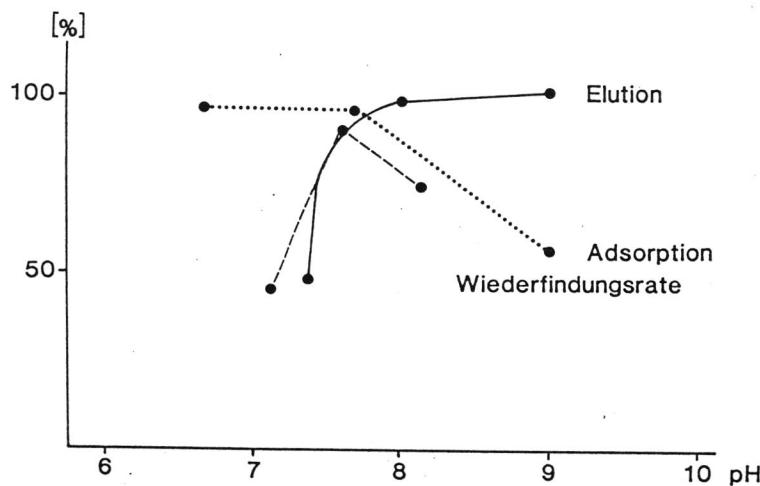


Abb. 7: Adsorptions-, Elutions- und Wiederfindungsrate in Abhängigkeit vom pH-Wert der Wasserprobe

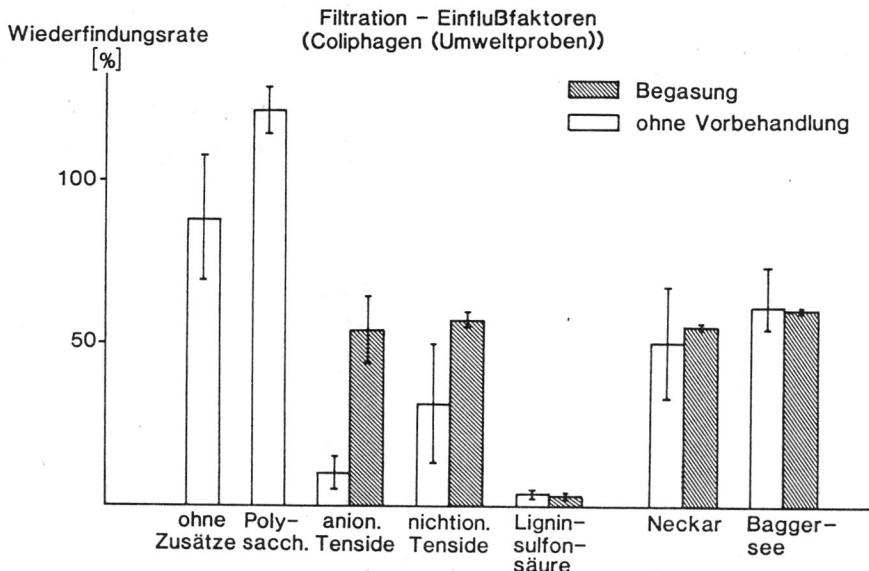


Abb. 8: Inhaltsstoffe des Wassers, die die Filtration beeinflussen können. Vorbehandlung der Wasserprobe durch Begasung (Luft)

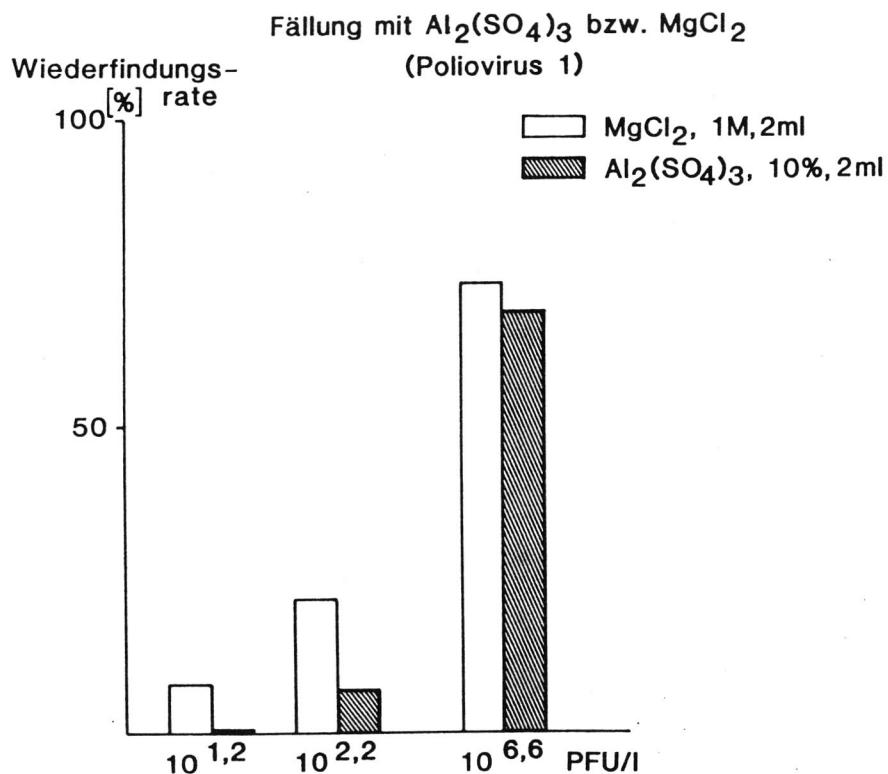


Abb. 9: Aufkonzentrierung von Polioviren im Wasser

Fällung - Einflußfaktoren

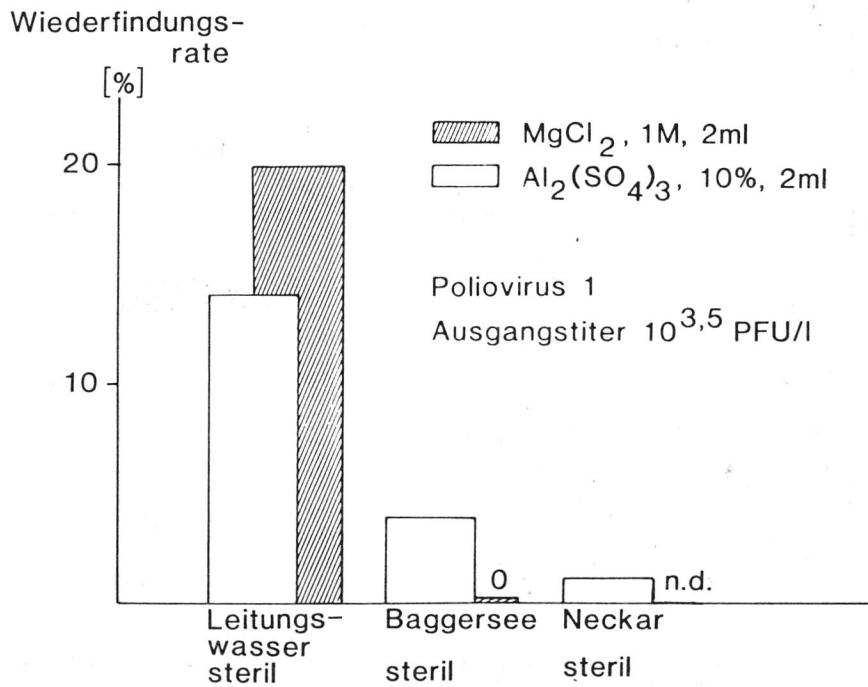


Abb. 10: Aufkonzentrierung von Polioviren im Wasser - Beeinflussung durch Inhaltsstoffe des Wassers (n.d. = nicht durchgeführt)

Absterberaten in Abhangigkeit von der Ozonkonzentration (bei 20 °C)

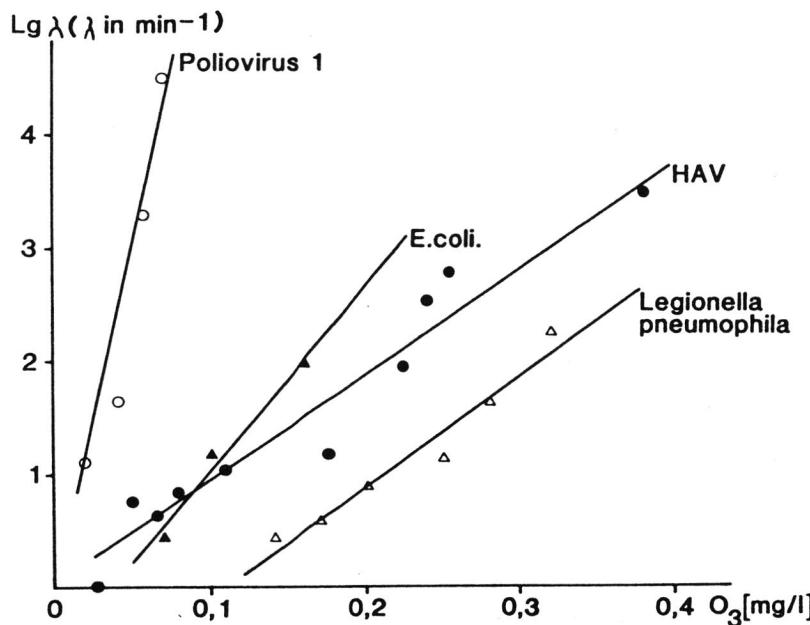


Abb. 11: Absterberaten in Abhangigkeit von der Ozonkonzentration (im Fließ-
gleichgewicht; 20 °C)

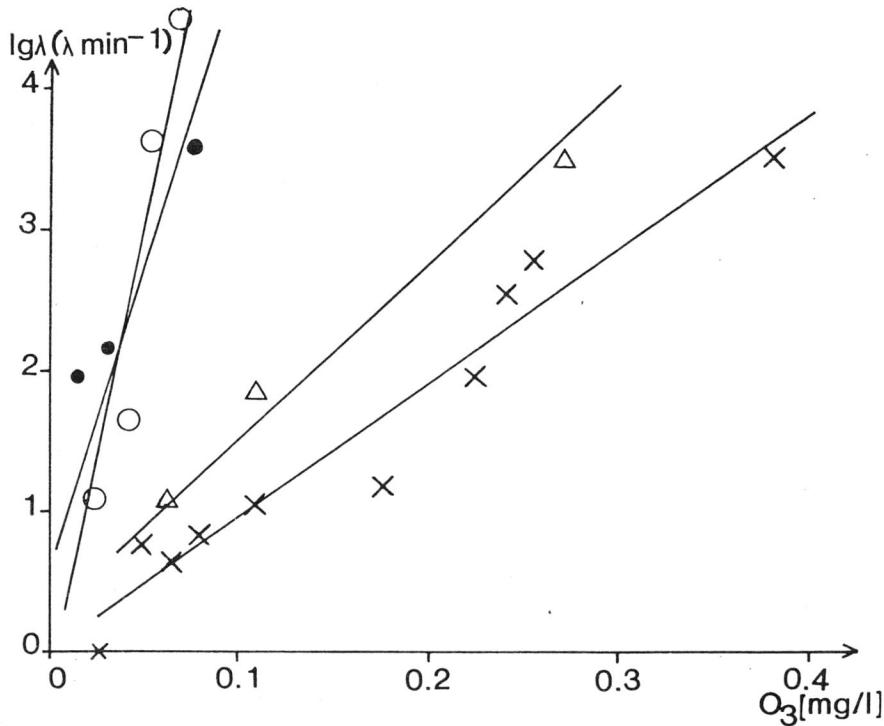


Abb. 12:

Absterberaten in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration bei HAV ($10^\circ\text{C} \Delta$, $20^\circ\text{C} \times$) und Poliovirus 1 ($10^\circ\text{C} \bullet$, $20^\circ\text{C} \circ$)

Untersuchungen zur Virusbelastung von Fließgewässern (Aare) in der Schweiz

S. Guyer und R. Walter

ZUSAMMENFASSUNG

Mit einer virologischen Studie der Aare im Raum Bern wurde festgestellt, daß Kläranlagen einen wesentlichen Einfluß auf die Virusbelastung haben. Die Viruselimination in der untersuchten Kläranlage mit 4 Reinigungsstufen betrug im Mittel 72% und muß als ungenügend betrachtet werden. Es konnten die üblichen Wasserviren wie Polio-, Coxsackie B- und Echoviren identifiziert werden.

EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

80% aller Haushaltungen in der Schweiz sind an kommunale Kläranlagen angeschlossen. Damit ist es in den letzten Jahrzehnten gelungen, die Wasserqualität der Schweizer Seen und Flüsse deutlich zu verbessern. Sie stehen nunmehr der Bevölkerung in zunehmendem Maße als Freizeit- und Erholungsräume zur Verfügung. 16% des Schweizer Trinkwassers wird aus Oberflächenwasser gewonnen, daher wird es periodisch chemisch und bakteriologisch analysiert. Virologische Untersuchungen zur Beurteilung der Eignung als Erholungsgewässer und als Trinkwasserresource wurden in der Schweiz erstmals im Rahmen der vor gestellten Studie durchgeführt.

MATERIAL UND METHODE

Gegenstand unserer Untersuchungen war ein 70 km langer Abschnitt des Flusses Aare ober- und unterhalb von Bern.

Die Aare entspringt am Gotthardmassiv, sie ist 300 km lang und mündet in den Rhein. Aufgrund des Gebirgsflußcharakters treten extrem unterschiedliche Wasserführungen zwischen 40-300 m³/sec auf.

Die Untersuchungen begannen im ersten Drittel des Aarelaufes und zwar bei Interlaken und endeten unterhalb von Bern. Damit sollte geprüft werden, ob die Aare durch Abwasser aus den vielen kleinen Gemeinden und aus der Landwirtschaft virologisch kontaminiert wird.

Für die virologischen Untersuchungen wurde das von Walter und Rüdiger entwickelte Anreicherungsverfahren verwendet [4].

10 l Wasser werden auf 20°C temperiert, unter Rühren werden 200 mg/l Al₂(SO₄)₃ x 18 H₂O dazugegeben und der pH auf 5,4-5,8 eingestellt. An die sich bildenden Aluminiumhydroxid-Flocken werden die Viren adsorbiert. Nach Sedimentation der Flocken wird der Überstand abgesaugt und 30 min bei 3.000 g zentrifugiert. Das Sediment wird in einem Zitratpuffer bei pH 4,7 gelöst. Das Lysat wird 4 h bei 100.000 g zentrifugiert und der Niederschlag in 2 ml resuspendiert. Die quantitative Virenzüchtung erfolgt nach dem MPN-Schema von Chang et al. [2] auf FL-Zellen. Die Inkubationszeit betrug 20 Tage (4 Passagen). Durch die Anreicherung von 5.000 : 1 ist eine Verarbeitung der Konzentrate mit einem ELISA, RIA oder dem Elektronenmikroskop möglich. Die Typisierung erfolgte mit dem Neutralisationstest unter Nutzung von Hyperimmunseren von Kaninchen. Dabei wurde sowohl mit gepoolten Seren (Polio, Cox B, Echo) als auch mit Einzelseren gearbeitet.

ERGEBNISSE

Von 9 Untersuchungsstellen konnten an 4 Entnahmestellen in der Nähe von Kläranlagen Viren isoliert werden. Ein deutlicher Anstieg zeigte sich unterhalb der Kläranlage von Bern. Daher war es erforderlich, die Strecke um Bern weiter zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden 12 km oberhalb der Kläranlage, d.h. direkt in der Stadt Bern, 4 m, 200 m und 6 km unterhalb des Einlaufes des gereinigten Abwassers der Kläranlage von Bern Untersuchungen an 3 Terminen zwischen dem 15.10. bis 01.12.1987 vorgenommen. Das geklärte Abwasser hatte eine mittlere Viruskonzentration von 204 MPNCU/l. 12 km vor der Kläranlage betrug die mittlere Viruskonzentration 0,4 MPNCU/l, 4 m nach dem Einlauf des gereinigten Abwassers fanden wir noch 99 MPNCU/l, 200 m und 6 km flußabwärts wurden noch 3 MPNCU/l festgestellt.

Da die Kläranlage einen so wesentlichen Verunreinigungsfaktor darstellt, erschien es notwendig, die viruseliminierende Effektivität der Anlage zu prüfen.

In dieser Anlage wurde das Abwasser von 220.000 Einwohnern und Industrieabwasser, welches einem Einwohnergleichwert von 500.000 entspricht, behandelt.

Vom 17.06. bis 22.10.1987 wurden insgesamt jeweils 10 Proben Rohabwasser und geklärtes Abwasser (Auslauf) quantitativ untersucht. Das Rohabwasser bestand aus einer um 9.00 Uhr entnommenen 1 Liter Schöpfprobe, während das geklärte Abwasser aus einer 24 h Mischprobe bestand. Die Werte des Rohabwassers bewegen sich zwischen 300 - 11'000 MPNCU/l, der Mittelwert beträgt 3'580 MNCU/l. Die Viruskonzentration des geklärten Wassers liegt zwischen 120 - 1'950 MPNCU/l, mit einem Mittelwert von 643 MPNCU/l. Stellt man die Viruskonzentration von Ein- und Auslauf gegenüber, so ergibt sich eine Viruseliminierung während aller 4 Verfahrensschritte der Anlage von im Mittel 72%. Weiterhin wurde ein deutlich saisonaler Rhythmus der Viruskonzentration des geklärten Abwassers beobachtet. Wird dies nun mit der gereinigten Wassermenge des entsprechenden Tages multipliziert, so ergibt sich eine durchschnittliche Belastung der Aare von 10^{11} MPNCU/Tag.

TYPISIERUNG

Von den insgesamt 256 Isolaten wurden 41 mit gepoolten Seren typisiert, dabei wurden folgende Gruppenzuordnungen bestimmt:

- 31 Coxsackie B Gruppe (B1 - B5)
- 3 Polio Gruppe (1-3)
- 4 Echo Gruppe (3, 7, 11, 30, 33)
- 3 nicht typisierbar (evtl. Adeno)

DISKUSSION

Der Virusnachweis in anthropogen belasteten Flüssen ist regelmäßig möglich, die MPN-Zahlen in verschiedenen Ländern liegen z.B. in Spanien bei 0,67 bzw. 5,8 MPNCU/l, in Frankreich bei 0,15-4,5 MPNCU/l, in der DDR bei 0,6-52 MPNCU/l [1]. Damit ist die Aare unmittelbar unterhalb der Kläranlage von Bern ein stark kontaminiertes Gewässer, während sie im Oberlauf kaum belastet ist. Infolge der Verdünnung durch die fließende Welle, der hohen Fließgeschwindigkeit und der Selbsteinigung ist bei 200 m unterhalb der Einleitung bereits ein starker Abfall der Viruskonzentration eingetreten.

In dieser Studie wurde nur der Gesamteffekt der Kläranlage, welche mechanische, chemische und biologische Behandlung sowie Sandfiltration umfaßt, getestet. Wie bereits berichtet, lag die mittlere Viruseliminierung bei nur 72%. Damit muß die Wirksamkeit der untersuchten Kläranlage gemessen am internationalen Niveau als nicht befriedigend eingeschätzt werden. Studien aus den USA berichten von 90%, andere Autoren beobachteten Eliminierungsraten von 93%, in Australien und in Indien sogar bis 99% [3]. Es wird daher empfohlen, die eingesetzten Verfahren der Abwasserbehandlung in der untersuchten Anla-

ge auf ihre Effektivität zu prüfen und zu optimieren. Dies betrifft insbesondere die biologischen und chemischen Verfahren. Derzeit stellt das gereinigte Abwasser ein deutliches Infektionsrisiko für die Nutzung der Aare unterhalb der Kläranlage dar.

LITERATUR

1. Bitton, G., Farrah, S.R., Montague, C., Binford, M.W., Scheuermann, P.R., and Watson, A.: Survey Of Virus Isolation. Data From Environmental Samples. Contract of Department of Environmental Engineering Sciences, Department of Microbiology and Cell Sciences and Florida State Museum, No. 68-03-3169, University of Florida, Gainesville.
2. Chang, S.L., Berg, G., Busch, K.A., Stevenson, R.E., Clarke, N.A., and Kabler, P.W.: Application of the "Most Probable Number" method for estimating concentrations of animal viruses by the tissue technique. Virology 6 (1958), 27 - 42
3. Rao, V.C., and Melnick, J.L.: Environmental Virology. American Society for Microbiology, Aspects of Microbiology 13, 1986
4. Walter, R. und Rüdiger, St.: Ein Zweistufenverfahren zur Virusanzahlberechnung aus Lösungen mit geringem Virustiter (z.B. Trinkwasser). Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology 25 (1981), 71 - 81

Adsorptions- und Transportverhalten von Viren bei Sandfiltration

H. Dizer

ZUSAMMENFASSUNG

Sowohl der Sand aus einem Grundwasserleiter als auch der Rieselgeboden verfügen über ein starkes Bindungsvermögen gegenüber Viren. Die Virusadsorption an den organisch belasteten Rieselgeboden war allerdings deutlich schwächer als an den Sand. Die kleineren Sandkornfraktionen und insbesondere die kolloidalen Sandanteile wiesen ein starkes Adsorptionsvermögen gegenüber Viren auf.

Unter den optimalen hydrogeologischen und physikochemischen Bedingungen findet eine effektive Viruselimination durch die Sandfiltration statt. Einige Faktoren wie die Fließgeschwindigkeit, die Belastungsdauer, sowie die organischen Inhaltsstoffe des Wassers beeinflussen die Eliminationsleistung des Filters.

Angesichts der langen Überlebensdauer von Viren im Grundwasser kann nicht ausgeschlossen werden, daß es bei einer zu hohen Fließgeschwindigkeit oder bei einer hohen organischen Belastung des Bodens und Sediments gelegentlich zu einem Durchbruch von Viren bis zum Grundwasser kommen kann.

EINLEITUNG

Pathogene Viren gelangen durch die tierischen und menschlichen Ausscheidungen ins Abwasser. Sie werden zwar in den Klärwerken ziemlich stark eliminiert [6, 16, 17], ihren geringen Konzentrationen in den behandelten Abwassern und kontaminierten Oberflächengewässern kommt jedoch eine große Bedeutung zu [3].

Da es bekannt ist und aus den Informationen dieser Tagung erneut hervorgegangen ist, daß Viren in Oberflächenwässern reichlich vorhanden sind [18], so müssen an die Verfahren der Trinkwasseraufbereitung solche Ansprüche gestellt werden, daß das aufbereitete Trinkwasser frei von Viren sein muß.

Sandfiltration stellt sich als ein wichtiger Reinigungsvorgang sowohl bei der Trinkwasseraufbereitung als auch bei der Grundwasseranreicherung und der Uferfiltration dar. Bei der Trinkwasseraufbereitung unterscheidet man je nach der Filtergeschwindigkeit zwischen Langsam- und Schnellsandfiltration. Nach der Definition von DIN Normen (19605) sind Langsamfilter offene Großflächensandfilter (bis 500 m) ohne Rückspülseinrichtung mit einer Filtergeschwindigkeit bis zu 5-20 cm pro Stunde. Dagegen sind die Schnellfilter offene oder geschlossene Filter, die mit einer Filtergeschwindigkeit bis zu 20 m pro Stunde betrieben werden [4].

Bei Langsamfiltern besteht die wirksame Filterschicht aus einer 40-120 cm Quarzsandschüttung mit einer oder mehrschichtiger Körnung von 0,2-0,6 mm. Die Filtergeschwindigkeit wird hier durch die Höheneinstellung des überstauten Wassers konstant gehalten.

Die Grundwasseranreicherung durch Filterbecken oder Uferfiltration unterscheidet sich nicht wesentlich von der Langsamfiltration. Man spricht vom Uferfiltrat, wenn das Wasser im Fluß oder im Vorfluter durch den Grundwasserleiter zu den Entnahmestellen dringt. Die Fließgeschwindigkeit des durchsickernden Wassers liegt sowohl in oberen Sedimentschichten als auch im Grundwasserleiter um 20 cm/Std. bzw. ca 5 m pro Tag [2].

Die künstliche Uferfiltration stellt sich bei geringer Entfernung zum Fluß und bei großen Entnahmemengen ein. Bei geringer Fließstrecke und starkem Absenken des Grundwasserspiegels können allerdings viele Merkmale des Flußwassers im Grundwasser erhalten bleiben.

Die Eliminierung von chemischen und mikrobiologischen Inhaltsstoffen des Wassers bei der Sandfiltration beruht grundsätzlich auf Filtrations- und Adsorptionsvorgängen, welche in erster Linie von hydrogeologischen und physikochemischen Eigenschaften des Sedimentes abhängen. In diesem Referat wurde der Einfluß einiger derartiger Faktoren auf das Adsorptions- und Transportverhalten von Viren im Sand und Boden besonders berücksichtigt.

MATERIAL UND METHODEN

Sediment: Bei den Untersuchungen wurden die Sandproben aus einem Grundwasserleiter in Kiel und die Bodenproben aus Berliner Rieselfeldern herangezogen. Die Bodenproben wurden aus einer Tiefe bis 10 cm entnommen. Über die mineralogischen und bodenkundlichen Eigenschaften dieser Proben wurde an anderen Stellen ausführlich berichtet [5, 15].

Enteroviren: Polio 3-, ECHO 7-, Coxsackie A9- und Coxsackie B1-Virus stammen aus dem Deutschen Referenzzentrum für Enteroviren in München. Sie wurden in permanenten Zelllinien vom BGM (Buffalo Green Monkey) kultiviert [7].

Die Adsorption von Viren an Sediment wurde durch Schüttelversuche getestet, während die Säulenversuche zur Untersuchung des Transportverhaltens von Viren eingesetzt wurden. Die Versuchsanordnungen wurden an anderer Stelle ausführlich beschrieben [14].

ERGEBNISSE

Einfluß der Korngröße des Sandes auf die Adsorption:

Wie bei allen Adsorptionsvorgängen ist die Virusadsorption in erster Linie virus- und sedimentartspezifisch. In einem Versuch haben wir das Adsorptionsverhalten von vier verschiedenen Enterovirusarten (Polio 3-, Cox. B1-, Cox. A9- und ECHO 7-Virus) zu verschiedenen Sandproben untersucht. Die Sandfraktionen waren Grob-, Mittel- und Feinsand sowie schluff- und tonhaltige kolloidale Partikel. In der Abbildung 1 wurden die Quotienten von freien, nicht gebundenen Viren zur gesamten Virenmenge in Prozent dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, daß die Adsorption von Polio 3-Viren an allen Sandfraktionen mit mehr als 99% am stärksten war. Dagegen wurden die Cox. B1-Viren an allen Sandfraktionen mit weniger als 90% am schwächsten adsorbiert.

Ferner ist hier zu erkennen, daß die gröbste Sandfraktion ein schlechtes Adsorbens für alle getesteten Viren, insbesondere aber für Cox. B1-Viren, war. Die Adsorption stieg in der Regel mit abnehmender Korngröße nur geringfügig an; sie war stets mindestens gleich der vorhergehenden Fraktion und nie geringer als diese.

Es war besonders auffallend, daß bereits 0,1 g kolloidalen Partikel (Korngröße 0,06 mm) viel mehr Viren adsorbierten als 1 g der anderen Sandfraktionen.

Adsorption der Viren an Sand und Boden:

Bei der Grundwasseranreicherung durch Sickerbecken oder durch Uferfiltration kommt es in den ersten Filter- bzw. Sedimentschichten zu einer Anreicherung von organischen Inhaltsstoffen des aufgebrachten Wassers. Dies kann man in den Oberböden von Rieselfeldern sehr deutlich erkennen. Es stellt sich daher die Frage, ob oder wie weit die organischen Anreicherungen derartiger Böden aufgrund ihrer hohen Austauschkapazität die Elimination von Viren beeinflussen.

In einem weiteren Versuch wurde die Virusadsorption an Sand und einem Rieselfeldboden miteinander verglichen, wobei der Sand im Verhältnis von 1:0; 3:1, 1:1; 1:3 und 0:1 mit dem Rieselfeldboden versetzt wurde. Der pH-Wert der Suspension war auf pH 5,1 eingestellt. In der Abbildung 2 wurde der nicht adsorbierte, im Überstand verbleibende Anteil der eingesetzten Viren in Prozent dargestellt.

Wie hier ersichtlich ist, adsorbierten alle getesteten Viren an Sand wesentlich stärker als an Boden. Dies ließ sich vor allem bei Polio 3-, ECHO 7- und Cox. B1-Viren erkennen. Diese Viren wurden an reinem Sand bei pH 5,1 mehr als 92% gebunden. Im Rieselboden bleiben sie dagegen 50-80% ungebunden in der Suspension. Die Vermischung des Sandes mit dem Rieselboden führte schon im Verhältnis 1:3 zu einer rapiden Abnahme der Adsorption von Polio 3- und ECHO 7-Viren. Diese Reduktion trat bei Cox. B1-Viren zwar langsammer, aber mit Zunahme des Bodenanteils im Gemisch steigend auf.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die hohe Ionen-Austauschkapazität eines humusreichen Bodens auf keine Verbesserung, vielmehr auf eine Verminderung der Viruselimination hindeutet.

Einfluß des pH-Wertes der Suspension auf die Adsorption:

Eine pH-Abhängigkeit der Adsorption ließ sich bei Sandproben viel stärker erkennen als bei Bodenproben. So lag z.B. die Adsorption von Polio 3-Viren mit 98%, von ECHO 7-Viren mit 98%, von Cox. B1-Viren 92% an Sand bei pH 5,1 im Maximum. Lediglich war die Adsorption von Cox. A9-Viren bei pH 7,2 etwas stärker als bei pH 5,1.

Bei den Bodenproben konnte insgesamt eine geringe Abhängigkeit der Adsorption vom pH-Wert festgestellt werden.

Bei der Bewertung der dargestellten Ergebnisse muß man vor allem berücksichtigen, daß eine sehr hohe Virenmenge (10^7) mit 1 g bzw. 0,1 g der jeweiligen Sandfraktionen versetzt wurde. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse im allgemeinen auf eine starke Virusadsorption sowohl an Sand als auch an Boden hin. Die Adsorptionsraten zeigen, daß 90-99% der gesamten Virenmenge, d.h. mehr als 10^6 pfu Viren von 1 g Sand, und 20-80% der Virenmenge, d.h. etwas weniger als 10^6 pfu Viren von 1 g Boden sorptiv zurückgehalten worden ist.

Bei diesen Versuchen waren allerdings die optimalen Bedingungen für die Virusadsorption gegeben. Bei einem Filtrationsprozeß ist dagegen die Kontaktaufnahme von Viren mit der Sandoberfläche durch das sickernde Wasser viel kürzer. Daher ist zu erwarten, daß die Effektivität der Virusadsorption bei Säulenversuchen wesentlich schwächer sein wird als bei Schüttelversuchen.

In den zahlreichen Studien wurde über das Transportverhalten von Viren im Untergrund von Sickerbecken von Silage- und Schlammgruben berichtet. In der Abbildung 1 sind einige Ergebnisse aus diesen Studien zusammengestellt.

Sie zeigen, daß die Sedimentpartikel die Viren bei einem Filtrationsvorgang nicht so effektiv eliminieren, wie es bei den Schüttelversuchen der Fall war. So konnten z.B. Enteroviren in einer Sandfiltrationsanlage in einer Tiefe von 29 m und einer Breite von 183 m nachgewiesen [21] werden.

Transportverhalten einiger Enteroviren in Sand und Boden:

Die Migration von Viren in Sedimentschichten ist von äußerst komplexer Natur und in erster Linie durch die hydrogeologischen und physikochemischen Eigenschaften des Untergrundes bestimmt. Darüberhinaus findet man in der Literatur unterschiedliche Angaben über ihr Transportverhalten je nach der Art des Sediments und der Belastung (Tab. 1). Es sollten hier einige Faktoren erwähnt werden, welche die Virusmigration besonders beeinflussen.

Einfluß der Fließgeschwindigkeit auf den Virustransport:

Die Fließgeschwindigkeit des durchsickernden Wassers - also eine Funktion der Porosität bzw. der Korngröße des Sediments - nimmt mit steigender Korngröße zu.

Wir haben die Migration von Cox. B1-Viren in einer Sandsäule (Korngröße 1 mm) in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit des durchsickernden Wassers (0,5, 1, 2 und 5 m/d) untersucht. Die Säulen (20 cm Höhe und 5 cm Durchmesser) wurden durch eine einmalige Virusinokulation von 2×10^8 pfu belastet. Diese Menge entspricht einer Virusbelastung von 10^6 pfu pro cm^2 Filteroberfläche. Das Volumen des gesamten Wasserträgers von 1,2 Liter und damit die gesamte Fließstrecke von 180 cm waren bei allen Säulen konstant.

In der Abbildung 3 wurde die Verteilung der in der Säule zurückgebliebenen Viren in Prozent dargestellt.

Wie hier zu erkennen ist, wurden Cox. B1-Viren bei allen getesteten Fließgeschwindigkeiten zu mehr als 90% innerhalb der ersten 3 cm zurückgehalten. Allerdings war der Einfluß der Fließgeschwindigkeit auf die Eindringtiefe der Viren sehr deutlich. Bei 0,5 m/d Filtergeschwindigkeit wurden 65% der Viren im ersten cm der Säule nachgewiesen. Bei 5 m/d Filtergeschwindigkeit betrug die Elimination im ersten Zentimeter lediglich 10%.

Dieser Einfluß wird deutlicher, wenn man die Menge an Viren im 5. cm der Säule gegen die Fließgeschwindigkeit aufrät (eingerahmte Abbildung). In dieser Tiefe betrug der Anteil der wiedergefundenen Viren mit zunehmender Fließgeschwindigkeit 0,01; 0,5; 1,4 und 2,7%.

Einfluß der Wasserinhaltsstoffe auf den Virustransport:

In einem weiteren Versuch wurden die Säulen mit dem Wasser unterschiedlicher organischer Inhaltsstoffe belastet. Hierbei haben wir als Perkolationslösung destilliertes Wasser, eine 0,1%ige Tensid- oder Huminsäurelösung und ein biologisch gereinigtes Abwasser genommen. In der Abbildung 4 wurde die Verteilung von Viren in der Säule prozentual dargestellt.

Wie daraus zu ersehen ist, betrug die Elimination von Cox. B1-Viren nach der Berieselung mit destilliertem Wasser 97% innerhalb der ersten 2 cm der Sandsäule.

Nach einer Belastung mit 0,1%iger Tensidlösung wurden lediglich 37% der gesamt eliminierten Viren in gleicher Tiefe gefunden. In einer Tiefe von 6 cm konnten 99% der Viren nachgewiesen werden.

Durch das Aufbringen einer 0,1%igen Lösung von Huminsäuren und eines biologisch gereinigten Abwassers erfolgte lediglich eine Elimination von etwa 90% innerhalb der Wanderungsstrecke von 6 cm.

Einfluß des Rieselfeldbodens auf den Virustransport:

In diesen Versuchen wurde das Transportverhalten von Cox. B1-Viren und Polio 3-Viren im Sand und Rieselfeldboden miteinander verglichen. Hierbei wurden die Fließgeschwindigkeit des Wassers mit 2 m/d und das Durchflußvolumen von 2,3 l konstant gehalten. Ferner wurde das dest. Wasser für den pH 5,1 und den pH 7,2 gepuffert.

In der Abbildung 5 wurde der Anteil derjenigen Viren dargestellt, die während der gesamten Versuchsdauer die 10 cm mächtige Sand- oder Bodensäule durchbrochen hatten.

Wie bei den Schüttelversuchen war auch hier die Adsorptions- bzw. Eliminationsrate der Viren in der Sandsäule wesentlich stärker als in der Bodensäule. Im Mittel von 3 verschiedenen pH-Ansätzen lag die Transportrate von Polioviren in der Sandsäule bei 3%, in der Bodensäule bei 40%. Diese betrug bei Cox. B1-Viren in den Sandsäulen 10% und in den Bodensäulen 38%.

Der pH-Wert des durchfließenden Wassers beeinflußte lediglich den Transport von Cox. B1-Viren sowohl in den Sand- als auch in den Bodensäulen. Hierbei trat die maximale Elimination von Viren bei pH 5,1 mit 99,4% in den Sandsäulen und mit 65,7% in der Bodensäule auf.

Einfluß der Persistenz auf den Virustransport:

Da die Adsorptionsvorgänge zwischen Viren und Sedimentpartikel reversibel sind, können die sorptiv eliminierten Viren unter Umständen desorbiert und weiter transportiert werden, falls sie nach ihrer Adsorption noch persistieren.

In der Tabelle 2 wurde die Überlebensdauer von Enteroviren in verschiedenen Biozonen aus einigen Literaturangaben zusammengestellt.

Im allgemeinen bestehen hier große Differenzen, die von unterschiedlichen physikochemischen Bedingungen und verschiedenen Bestimmungsverfahren herröhren können. Man kann jedoch festhalten, daß Enteroviren unter durchschnittlichen Millieumbedingungen (10-15°C / pH 6-7,5) in der Umwelt lange Zeit überleben können.

Wir haben auch die Überlebensdauer unserer Testviren im Grundwasser und in den mit Grundwasser gesättigten verschiedenen Sedimentfraktionen getestet. In der Abbildung 6 wurde die Viruselimination in einem rohen Grundwasser bei einer Temperatur von ca. 10°C innerhalb der Versuchsdauer von 260 Tagen dargestellt.

Die Elimination aller Viruskulturen im rohen Grundwasser ist im wesentlichen schwach und langsam. Alle angesetzten Viren erfahren nach 50 Tagen eine Elimination von 90-99%. Danach aber verliefen die Überlebenskurven stabiler als am Anfang. Eine weitere Elimination von Viren betrug in den meisten Fällen nur noch eine Zehnerpotenz bis zu 260 Tagen.

Die Überlebensfähigkeit von Viren in den mit Grundwasser gesättigten Sandproben zeigten auch ähnliche Ergebnisse (Tab. 3). Es konnte auch bei diesen Proben eine Titerabnahme von 90-99% innerhalb von 50 Tagen festgestellt werden. Erst nach einem Jahr erreichte die Viruselimination bei einigen Ansätzen 4-5 Zehnerpotenzen. Nach 2 Jahren waren fast alle Viren zwar lediglich sporadisch, jedoch noch immer nachweisbar.

Zwischen den einzelnen Virustypen konnte kein großer Unterschied hinsichtlich ihrer Überlebensfähigkeit festgestellt werden.

DANKSAGUNG

Die Untersuchungen wurden im Rahmen des durch den Bundesminister für Forschung und Technologie (BMFT) geförderten Forschungsprojektes 02 WT 509-3 durchgeführt.

Der Autor dankt Frau Schlaak und Frau Tischer für gewissenhafte technische Assistenz.

LITERATUR

1. Akin, E.W., Benton, W.H., und Hill, W.F.: Enteric viruses in ground and surface waters. A review of their occurrence and survival. 13. Water Qual. Conf. (1971), 59 - 75, Illinois, USA
2. Anonymus: Uferfiltration. Bericht des BMI-Fachausschusses "Wasserversorgung und Uferfiltrat" (1975), S. 182, Bundesministerium des Innern, Bonn, BRD
3. Anonymus: Human viruses in the aquatic environment. EPA-Veröffentlichung, 570/9-78-006 (1978), Environmental Research Center, Ohio, USA
4. Anonymus: DIN-Taschenbuch 12, Wasserversorgung 1. DIN-Nr.: 19 605 (1985), 183 - 188, Beuth Verlag GmbH, Berlin, Köln, BRD
5. Aurand, K., Dizer, H., Filip, Z., Kunowski, J., Milde, G., Neumayr, V., und Seidel, K.: Erste Ergebnisse von vergleichenden Untersuchungen an langfristig mit Abwasser belasteten Böden zur Beurteilung der Reinigungsvorgänge durch den Untergrund bei der künstlichen Grundwasseranreicherung. DVGW-Schriftenreihe, Wasser 102 (1980), 141 - 146, Berlin, BRD

6. Buras, N.: Concentration of Enteric Viruses in Wastewater and Effluent. A Two Year Survey. *Water Res.* 10 (1975), 205 - 290, UK.
7. Dizer, H., Nasser, A., und Lopez, J.M.: Penetration of different human pathogenic viruses into sand columns percolated with distilled water, groundwater, or wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984), 409 - 415, USA
8. Dizer, H., und Lopez Pila, J.M.: Adsorption ausgewählter Enteroviren an Sand aus einem Grundwasserleiter. *Zbl. Bakt. Hyg. B* 185 (1988), 548 - 559, BRD
9. Drewry, W.A., and Eliasse, R.: Virus movement in groundwater. *J. Wat. Pollution Control* 40 (1968), 257 - 271, USA
10. Gerba, C.P., Wallis, C., and Melnick J.L.: Viruses in Water. The problem, some solutions, *Environm. Sci. Tech.* 9 (1975), 1122 - 1126, USA
11. Lance, J.: Virus movement in soil columns flooded with secondary sewage effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 32 (1976), 520 - 526, USA
12. Lance, J.C., and Gerba, C.P.: Poliovirus Movement During High Rate Land Filtration of Sewage Water. *J. Environ. Qual.* 9 (1980), 31 - 34, USA
13. Landry, E.F., Vaugh, J.M., and Penello, W.F.: Poliovirus Retention in 75 cm Soil After Sewage and Rainwater Application. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 (1980), 1032 - 1038
14. Nasser, A., Dizer, H., und Lopez J.M.: Elimination of viruses after secondary and tertiary sewage treatment and by sand filtration. *Monogr. Virol.* 15 (1984), 163 - 170, UK.
15. Riemer, R.: Untersuchungen zum Transportverhalten von Bakterien in sandigen und kiesigen Filtermedien. *Nat. wiss. Diss. Univ. Kiel*, BRD (1983)
16. Schwarzbrod, L., Vilagines, Ph., Schwarzbrod, B. Surette, Vilagines, R., and Collomb, J.: Evaluation of the Viral Population in Two Wastewater Treatment Plants. *Water Res.* 19 (1985), 1353 - 1356, USA
17. Schwarzbrod, L., and Mathieu, C.: Virus Recovery from Wastewater Treatment Plant Sludges. *Wat. Res.* 20 (1986), 1011 - 1013

18. Walter, R., Dobberkau, H.-J., Bartel, W., Diener, W., Härtel, I., Heinrich, U., Rüdiger, S., and Stetttnisch, B.: Long-Term Study of Virus Contamination of Surface Water in the German Democratic Republic. Bulletin of the World Health Organisation, 80 (1982), 789 - 796, USA
19. Welke, G., Fridrich, U., und Mai, K.: Untersuchungen zur Inaktivierungszeit von ECHO-Viren 6, 11, 30 und 33 in Wasserproben. Z. f. gesamt. Hyg. u. ihre Grenzgebiete 19 (1973), 353 - 357, DDR
20. Woughn, J.F., Landry, F.E., Baranosky, L.J., Beckwith, C.A., Dahl, M.C., und Delihas, N.C.: Survey of human virus occurrence in wastewater-recharged groundwater on Long Island, Appl. Microbiol. 36 (1978), 47 - 51, USA
21. Yeager, J.G., and O'Brien, R.T.: Structural Changes Associated with Poliovirus Inactivation in Soil. Appl. Environ. Microbiol. 38 (1980), 702 - 709, USA

Tab. 1: Migration einiger enterotroper Viren in Säulen- und Feldversuchen

Virusart	Versuchsform	Art des Sedimentes	Distanz (m)	Elimin.-rate	Lit.
Coxsackie	Säulenvers. Quellwasser	Gartenboden	0,9	50%	[10]
Coliphagen	--	--	0,6	22%	[10]
Polio 1 u. Coliphg. T7	Säulenvers. dest. Wasser	Waldboden (sandig)	0,2 0,2	97% 88%	[10] [10]
--	Abwasser	--	0,3	99%	[10]
Polio 1 u. Polio 3	Säulenvers. Abwasser	kalk. Sand lehm. Sand	2,5 1,6	99,9% 99,99%	[11, 12] [11, 12]
Coliphagen T1, T2, T7	Säulenvers.	lehmiger Boden	0,5	> 99%	[9]
			Tiefe (m)	Breite (m)	
Polio 1 u. ECHO 7, 11	Feldversuch Abwasser	org. Boden u. lehmm. Sand	3	7-38	[20]
Enteroviren	Schlamm- ablagerung	lehmm. Sand	12	46	[13, 21]
Enteroviren Coliphg. f2	Schnell- sandfilt.	lehmm. Sand	29	183	[3, 21]

Tab. 2: Überlebensdauer einiger enterotroper Viren in verschiedenen Wasserproben

Virus	Wasser	T a g e		Literatur
		1 - 10 C	20 - 25 C	
Polio 1-3	Leitungsw. dest. Wasser	231 231	91 112	Lefler u.Kott (1975)
Polio 1-3	Seewasser Flußwasser Leitungsw.	30 - 130 19 - 75 140 - 168	2 - 8 8 - 20 95	[1]
Cox. A9	Flußwasser Leitungsw.	10 - 20 98	8 15	[1]
Cox. B3	Seewasser Flußwasser	90 75	2 - 28 2	[1]
ECHO 7	Flußwasser Leitungsw.	15 - 26 85	7 - 16 10	[1]
ECHO 12	Flußwasser Leitungsw.	19 - 33 130	5 - 12 11	[1]
ECHO 7, 30 u. 33	Flußwasser	560	320	[19]
Coliphage f2	Leitungsw. dest. Wasser	35 231	77 77	Lefler u.Kott (1975)
Coliphage T7	Grundwasser Oberflächenw.	64 64	64 21 - 35	Niemi (1975)

Tab. 3: Inaktivierung einiger Enteroviren im Grundwasser unter Zusatz von 3 verschiedenen Sandfraktionen in Abhängigkeit von der Zeit

		ZEIT (TAGE)				
Ansätze		0	50	260	360	720
Coxsacki B 1	Grobs. + Gew.	$8.8 \cdot 10^6$	$9.8 \cdot 10^5$	$7.9 \cdot 10^5$	$1.5 \cdot 10^5$	$2.5 \cdot 10^2$
	Mittels. + GW	$8.8 \cdot 10^6$	$1.8 \cdot 10^5$	$7.9 \cdot 10^5$	$1.5 \cdot 10^5$	$3.7 \cdot 10^2$
	Feins. + GW	$8.8 \cdot 10^6$	$1.8 \cdot 10^6$	$9.8 \cdot 10^5$	$1.5 \cdot 10^5$	$1.0 \cdot 10^1$
Coxsacki A 9	Grobs. + GW	$3.0 \cdot 10^4$	$2.8 \cdot 10^3$	$1.2 \cdot 10^2$	0	0
	Mittels. + GW	$3.9 \cdot 10^4$	$1.2 \cdot 10^3$	$1.2 \cdot 10^1$	0	0
	Feins. + GW	$3.0 \cdot 10^4$	— (kontam.)	—	—	—
Echo 7	Grobs. + GW	$3.7 \cdot 10^6$	$3.9 \cdot 10^5$	$1.5 \cdot 10^5$	$2.8 \cdot 10^3$	(kontam.)
	Mittels. + GW	$3.7 \cdot 10^6$	$2.1 \cdot 10^5$	$3.9 \cdot 10^4$	$1.6 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^1$
	Feins. + Gw	$3.5 \cdot 10^5$	(Zellkultur verunreinigt)	$5.9 \cdot 10^3$	$4.7 \cdot 10^1$	(kontam.)
Polio 1	Grobs. + GW	$9.8 \cdot 10^5$	$7.0 \cdot 10^4$	$1.4 \cdot 10^4$	$5.9 \cdot 10^3$	(kontam.)
	Mittels. + GW	$3.7 \cdot 10^6$	$7.0 \cdot 10^4$	$2.8 \cdot 10^3$	$5.6 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^1$
	Feins. + GW	$1.2 \cdot 10^5$	$7.0 \cdot 10^4$	$1.2 \cdot 10^3$	$5.6 \cdot 10^2$	(kontam.)

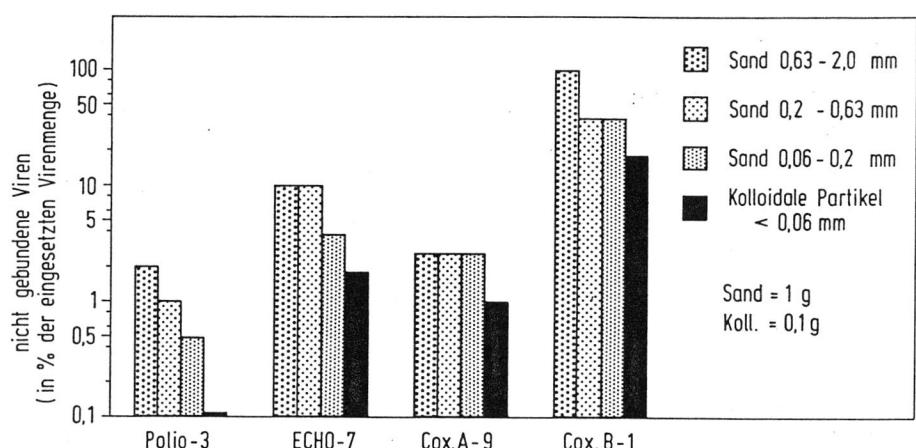


Abb. 1: Einfluß der Sandkorngröße auf die Adsorption einiger Enteroviren

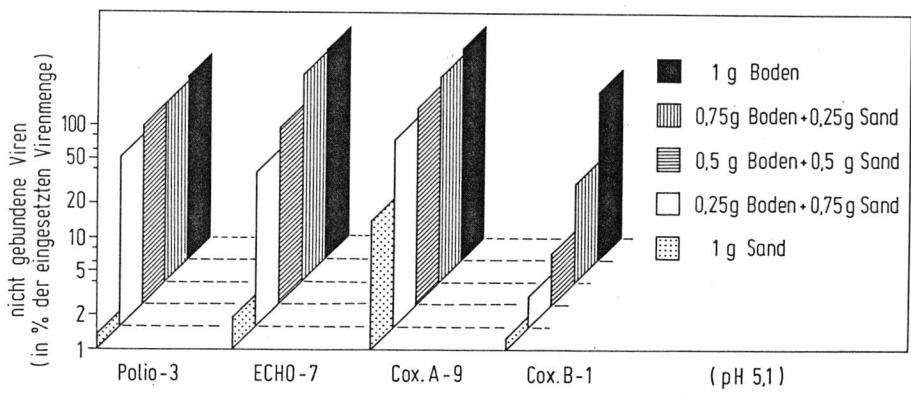


Abb. 2: Adsorption einiger Enteroviren an Gemischen aus Sand und Rieselfeldboden

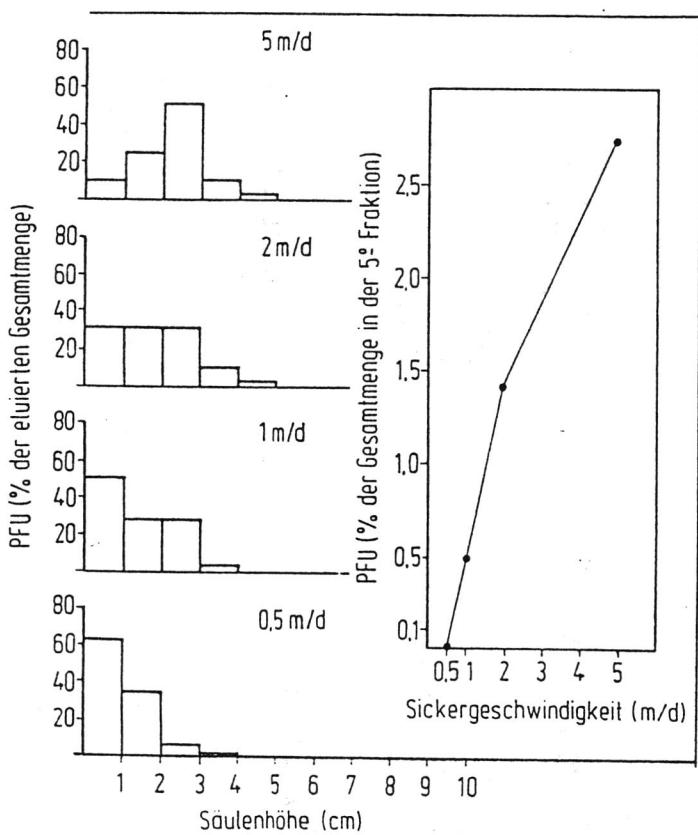


Abb. 3: Verteilung von Coxsackie B1-Viren in Sandsäulen bei verschiedenen Abstandsgeschwindigkeiten

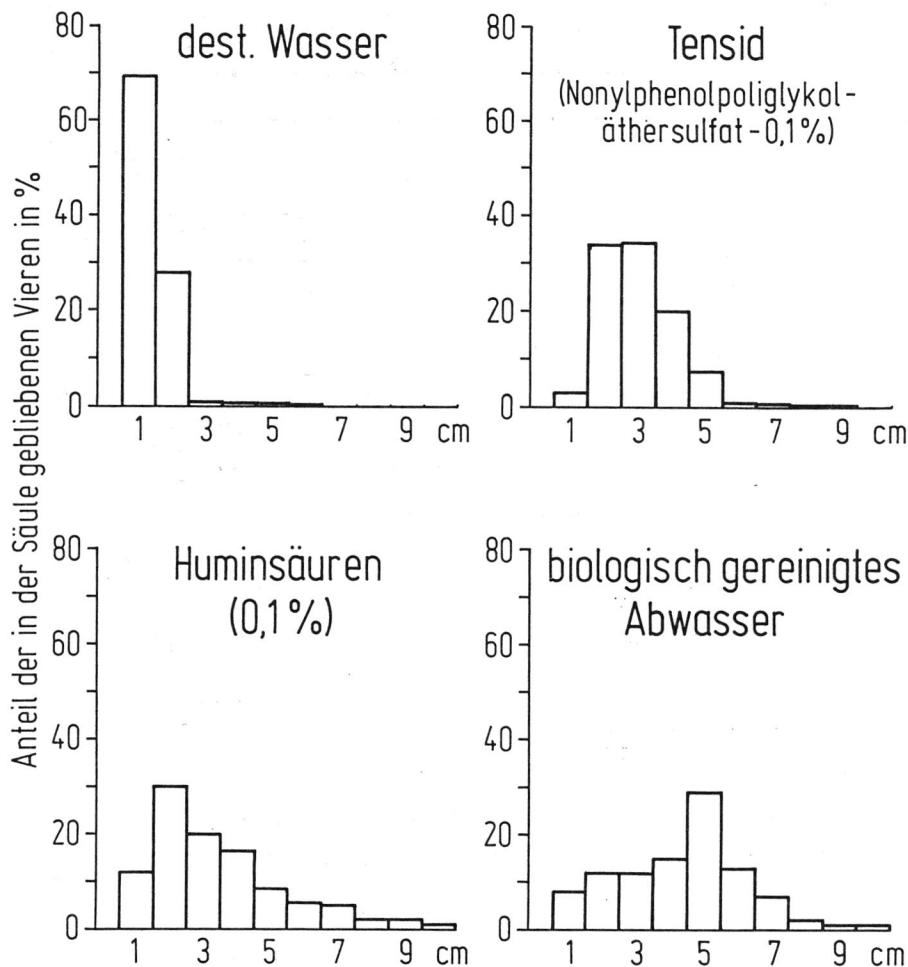


Abb. 4: Verteilung von Coxsackie B1-Viren in Sandsäulen nach der Perkolation mit verschiedenen Lösungen

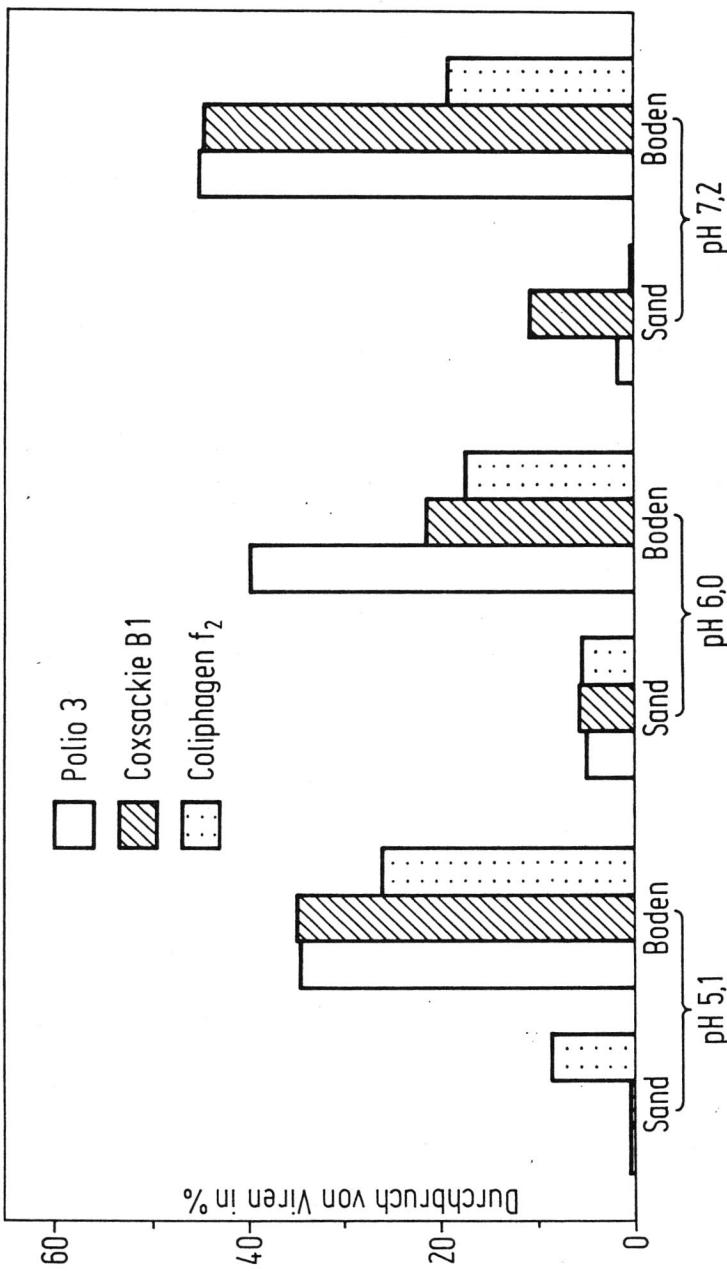


Abb. 5: Durchflußrate einiger enterotroper Viren in Sand- und Rieselfeldböden bei verschiedenen pH-Werten

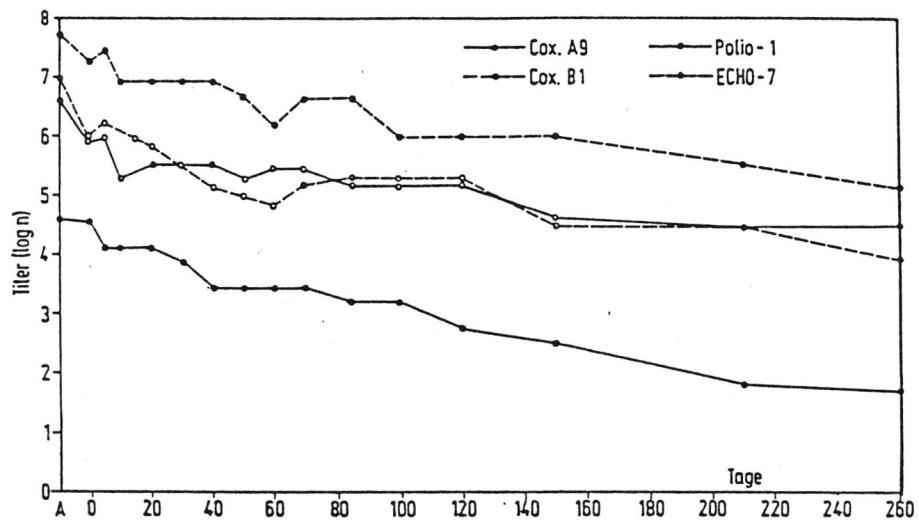


Abb. 6: Inaktivierungsrate einiger Enteroviren in rohem Grundwasser bei einer Temperatur von 10°C

Inaktivierung von Viren bei der Klärschlammbehandlung

F. Traub, S. K. Spillmann, M. Schwyzer und R. Wyler

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Filter-Sandwich-Methode entwickelt, mit der die Inaktivierung von Viren während verschiedener Klärschlamm-Behandlungsverfahren zu verfolgen war. In die Untersuchung wurde der Bakteriophage f2, ein Coxsackie-, ein Rota- sowie ein bovinus Parvovirus miteinbezogen.

Während der anaerob mesophilen Faulung büßten das Rota- und das Coxsackievirus nur unwesentlich an Infektiosität ein. Dies im Gegensatz zum Parvovirus und zum Bakteriophagen, die einen ausgeprägteren Infektionsverlust erlitten. Höhere Prozess-Temperaturen von 56°C (anaerob thermophile Faulung) und 61°C (anaerob thermophile Fermentation) jedoch führten zu einer raschen Inaktivierung von Rota- und Coxsackievirus, bei 60°C innerhalb von Minuten. Der Bakteriophage f2 und das Parvovirus erwiesen sich als thermostabiler, wobei dies besonders für das Parvovirus zutraf, welches auch bei einer Pasteurisierung (70°C) innerhalb einer halben Stunde nur einen Titerverlust von $0,7 \log_{10}$ erfuhr. Die vier untersuchten Viren ließen sich in zwei Gruppen einteilen: thermostabile-chemolabile Viren (Parvovirus, Bakteriophage f2) und thermolabile-chemostabile Viren (Rota- und Coxsackievirus).

Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß neben der Temperatur auch chemische sowie mikrobiologische Faktoren zur Inaktivierung von Viren bei der Klärschlammbehandlung beitragen.

EINLEITUNG

Verschiedene Viren des Digestionstrakts gelangen über das Abwasser in den Klärschlamm. Wird der Klärschlamm als Dünger in der Landwirtschaft verwendet, sollte er zuvor hygienisiert und frei von potentiellen menschen- und tierpathogenen Viren sein.

Das Ziel unserer Untersuchung war, abzuklären, wie weit Viren während verschiedenen Klärschlammbehandlungsverfahren inaktiviert werden. Es wurde zu diesem Zwecke eine Filter-Sandwich-Methode entwickelt, die es erlaubt, *in situ* die Inaktivierung von Bakteriophagen, Enter-, Rota- und Parvoviren zu messen [13, 15].

MATERIAL UND METHODEN

Die Filter Sandwichtechnik

Elektropositiv geladene Zetapor-Nylonfiltermembranen (AMF, Cuno Div. Meriden, Connecticut, USA) mit 0,2 µm Poren (0,45 µm für Rotavirus) und einer Dicke von 70 µm dienten als Träger für Viren [12]. Die Filter wurden in Filterhalter eingespannt und autoklaviert. Mit einer Spritze wurde 5 ml Virussuspension (Stockvirussuspension 1:10 in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,0 verdünnt) durch eine Zetapormembran filtriert und die virustragende Membran beidseitig mit Nucleopore Polykarbonatmembranen (Nucleopore Corp. Pleasanton, CA, USA) unter Vermeidung von Luftblasen abgedeckt. Die Polykarbonatmembranen waren 6 µm dick und wiesen entweder Poren mit einem Durchmesser von 15 nm auf, wenn der Einfluß virusinaktivierender Faktoren im Klärschlamm zu messen war oder waren porenlös, wenn der Einfluß der Temperatur allein bestimmt werden sollte (Abb. 1). Jedes Filter-Sandwich wurde in einen Nucleopore Swin-Lock-Filterhalter eingeschraubt, dessen Eingangs- und Ausgangsöffnungen zu kreisrunden Öffnungen von 15 - 16 mm Durchmesser ausgefräst worden waren (Abb. 2). Es kamen pro Zeiteinheit je 4 Filter-Sandwiches mit porösen Polykarbonatmembranen und je 4 Filter-Sandwiches ohne Poren in den Polykarbonatmembranen zur Exposition. Alle Membranmaterialien sowie der Filterhalter erwiesen sich als chemisch und biologisch inert, thermostabil und autoklavierbar. Auch bei 14tägiger Exposition während einer thermophilen Schlammbehandlung nahm das Filter-Sandwich keinen Schaden. Die Adsorptionsrate bei der Beladung elektropositiver Filter mit Viren betrug für den Phagen f2 bei pH 6,3 mehr als 99,9%, für das Rotavirus und Coxsackievirus B5 100% (pH 6,0) und für das Parvovirus 95% (pH 6,0). Auch die Elutionseffizienz nach Mehrfachelution war gut: Phage f2 100%, Coxsackievirus B5 100%, Rotavirus 83% und Parvovirus 80% [13, 15].

Die Filter-Sandwiches wurden an Stahldrähten befestigt in Reaktoren gehängt, in denen die verschiedenen Klärschlammbehandlungsverfahren abliefen. Bei der anaeroben mesophilen Faulung wies der Reaktor einen Inhalt von 1800 m³, bei der anaeroben thermophilen Faulung einen von 8 m³, bei der anaerob thermophilen Fermentation (aerob thermophile Vorbehandlung) einen solchen von 7 m³ auf und bei der Pasteurisierung betrug das Reaktorvolumen 0,7 m³. Nach der Exposition wurden die Filterhalter in eisgekühltem Puffer gespült, im Labor die Virusträgermembran in ein steriles Filtergehäuse eingelegt und die ad-

sorbierten, exponierten Viruspartikel mit einer Pufferlösung, die 0,5 M NaCl und 4% Fleischextrakt pH 8,5 enthielt, eluiert. Um eine möglichst hohe Elutionsrate zu erreichen, mußte mit der gleichen Pufferlösung zweimal eluiert werden. Der Virusgehalt des Eluats wurde mittels Titration bestimmt, wobei nicht exponierte im Kühlschrank gelagerte Filter-Sandwiches als Kontrolle dienten [13, 15].

Viren und Bakterien

Der zu den Leviviridae gehörende Bakteriophage f2, der sich gegenüber äußeren Einflüssen ähnlich wie Enteroviren verhält (vermehrt in *E. coli* K-12 Hfr. CSH), ein Coxsackievirus B5 (vermehrt in HEp-2 Zellkulturen), ein bovinus Parvovirus Stamm Haden (vermehrt in bovinen embryonalen Lungenzellen), sowie der humane Rotavirussstamm Wa (vermehrt in MA 104 Zellen) kamen für die Versuche zur Anwendung. Wo immer möglich, wurde für den quantitativen Virussnachweis die Plaquemethode verwendet. Nur beim Rotavirus wurde die Titration mittels Endverdünnungsmethode ($TCID_{50}$) vorgenommen [10]. Um bakterielle und Pilzkontaminationen zu vermeiden, wurden die Medien und Overlays mit Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), Gentamicin (50 µg/ml) und Econazole (1 µg/ml) [22] versetzt. So ließen sich Kontaminationen auch bei der Auswertung lange in den Reaktoren exponierter Filter-Sandwiches vermeiden [13, 15].

Experimente in der Abwasserreinigungsanlage

Die Versuche fanden hauptsächlich in der Anlage des Abwasserverbandes Altenrhein (CH) statt. Es standen dort Pilotsysteme im Großmaßstab für die Prüfung verschiedener Klärschlamm-Hygienisierungsverfahren zur Verfügung. Die Bedingungen während der verschiedenen Behandlungsverfahren sind andernorts beschrieben [13, 15].

ERGEBNISSE

Eignung der Filter-Sandwichmethode

Die Filter-Sandwichmethoden, wie sie für die Bakteriophagen f2 ausgearbeitet wurde [15], ließ sich mit nur geringfügigen Modifikationen auch für das Coxsackievirus B5, den humanen Rotavirussstamm, sowie das bovine Parvovirus adaptieren [13].

Virusinaktivierungsversuche in der Anlage des Abwasserverbandes Altenrhein (CH)

Belebtschlammstufe

Es zeigte sich bei Versuchen mit dem Bakteriophagen f2, daß in dieser Phase praktisch auch bei maximaler Aufenthaltsdauer von 21 h keine Inaktivierung des Virus erfolgte. Experimente mit animalen Viren wurden deshalb nicht durchgeführt [15].

Anaerob mesophile Faulung

Während dieser konventionellen Klärschlammbehandlung büßten Rotaviren und Coxsackieviren nur unwesentlich an Infektiosität ein, wobei die thermische Inaktivierung bei Coxsackieviren etwas ausgeprägter war als bei Rotaviren. Die totale Inaktivierung durch die Temperatur und durch Faktoren im Klärschlamm war für beide Viren vergleichbar ($0,31$ resp. $0,47 \log_{10}$ pro Tag).

Anders verhielt sich die Inaktivierung des Parvovirus und des Phagen f2 während dieser Klärschlammbehandlung. Die thermische Inaktivierung war vergleichbar mit derjenigen von Rota- und Coxsackievirus B5. Die totale Inaktivierung jedoch war beim Parvovirus (Abb. 3) und beim Phagen f2 (Abb. 4) viel ausgeprägter, indem der Infektiositätsverlust etwa $1 \log_{10}$ pro Tag betrug.

Anaerobe thermophile Faulung

Die Temperatur von $54 - 56^\circ\text{C}$ des Reaktionsprozesses führte zur einer raschen Inaktivierung der Rota- und Coxsackieviren auf unterhalb der Nachweisgrenze liegende Titer. Dabei erwies sich das Rotavirus mit einer Inaktivierungsrate von $8,5 \log_{10}/\text{h}$ etwas resistenter als das Coxsackievirus mit einer Inaktivierungsrate von $0,9 \log_{10}/\text{min}$. (Abb. 5). Der Infektiositätsverlust des Phagen ($1,18, \log_{10}$ pro Stunde) war nicht allein durch thermische Inaktivierung bedingt, sondern wurde durch Faktoren im Klärschlamm deutlich verstärkt (Abb. 5). Das Parvovirus erfuhr nur eine geringgradige Inaktivierung ($0,2 \log_{10}/\text{h}$), die hauptsächlich thermisch bedingt war.

Aerobe thermophile Fermentation (aerob thermophile Vorbehandlung)

Bei der Prozeßtemperatur von $60 - 61^\circ\text{C}$ erfolgte der Infektiositätsverlust bei den Coxsackieviren mit $1,67 \log_{10}$ pro Minute äußerst rasch. Als etwas resistenter erwiesen sich Rotaviren ($0,75 \log_{10}/\text{min}$). Der Bakteriophage f2 erfuhr eine Inaktivierung von $3,54 \log_{10}$ pro Stunde, wobei die thermische Komponente vor allem wirksam war. Auch bei diesem Prozeß stellte sich das Parvovirus als äußerst thermostabil heraus, der Titerverlust betrug nur $0,4 \log_{10}$ pro Stunde.

Pasteurisierung

Nachdem Rota- und Coxsackieviren bei 60°C innerhalb Minuten inaktiviert wurden, prüfte man nur noch das Verhalten des Parvovirus und des Bakteriophagen bei der Pasteurisierung. Die Verweildauer des Klärschlamms betrug 30 Minuten bei einer Temperatur von 70°C. Wie Abbildung 6 zeigt, betrug die Titerreduktion des im Vergleich zu den Rota- und Coxsackieviren thermostabilen Phagen 8 \log_{10} in 30 Minuten, während für das Parvovirus in 30 Minuten bloß ein Titerverlust von 0,7 \log_{10} Einheiten zu registrieren war.

DISKUSSION

Das beschriebene Filter-Sandwichverfahren hat sich in der Praxis bewährt. Es weist gegenüber anderen Verfahren, wie z.B. das von Ur Rehman [16] entwickelte, den Vorteil auf, daß mit adsorbierten und nicht suspendierten Viruspartikeln gearbeitet werden kann. Dadurch werden die natürlichen Verhältnisse simuliert, da im Klärschlamm Viren ebenfalls adsorbiert an feste Materialien vorliegen. Es können weiter mit dem Sandwichverfahren auch Einflüsse anderer Faktoren als derjenige der Temperatur auf die Virusinfektiosität getestet werden, was mit dem Verfahren von Ur Rehman nicht möglich ist, weil die Virususpension in einem verschlossenen Röhrchen exponiert wird. Wie gezeigt, spielen andere Faktoren als die Temperatur bei der Inaktivierung verschiedener Viren eine Rolle, indem sie den durch die Temperatur hervorgerufenen Inaktivierungseffekt verstärken (in den Abbildungen als Gesamtinaktivierung bezeichnet). Mit welchen Faktoren wir es dabei zu tun haben, ist nicht völlig klar. Wenn freies NH_3 entsteht, kann man mit einem viruziden Effekt des Ammoniakgases rechnen [3, 4, 7]. Ward und Ashley [17, 18, 19] fanden Detergentien mit viruzider Wirkung im Abwasser. Weiter wurde nicht näher definierten Mikroorganismen eine viruzide Wirkung zugeschrieben [6]. Patti und Mitarbeiter beschrieben Hepatitis-A-virusinaktivierende Faktoren biologischer Natur im Flußwasser [9]. Auf alle Fälle hat sich in unseren Versuchen gezeigt, daß die Temperatur nicht als alleiniger inaktivierender Faktor zu betrachten ist. Das ließ sich besonders deutlich am Beispiel des thermostabilen Parvovirus zeigen (Abb. 3). Auch der Bakteriophage f2, bei dem die Gesamtinaktivierung ebenfalls nicht mit der thermischen Inaktivierung identisch war, bietet sich als weiteres Beispiel an. Auffallend ist der Befund, daß bei der mesophilen Faulung (35 - 36°C) die Gesamtinaktivierung aller Viren, inklusive Bakteriophage f2, ausgeprägter war als die thermische Inaktivierung, während bei Temperaturen von 55 - 61°C die thermische Inaktivierungskomponente überwog. Es wäre möglich, daß bei einer Temperatur von 36°C mikrobiologische und chemische Faktoren bei der Inaktivierung eine bedeutende Rolle spielen, die bei Temperaturen von 60 - 61°C

nicht mehr zum Tragen kommen, möglicherweise infolge Unterdrückung des Metabolismus bestimmter Mikroben. Bei Temperaturen von 60°C oder höher (und bei Laufzeiten des Experiments von Minuten) überwog eindeutig die thermische Inaktivierung.

Die vorliegenden Versuche ergaben, daß bei den thermophilen Klärschlamm-behandlungsverfahren Enteroviren und Rotaviren (zur Familie Reoviridae gehörend) rasch und vollständig inaktiviert werden, während das thermostabile Parvovirus auch nach einer Pasteurisierung (70°C) seine Infektiosität nur in geringem Grade verlor. Es hat sich jedoch gezeigt, daß zur Elimination der thermostabilen Parvoviren am ehesten die Kombination eines thermophilen Verfahrens mit einer mesophilen anaeroben Faulung in Frage kommt, wie das von anderer Seite auch beschrieben wurde [20].

Die Bedeutung humaner Parvoviren im Klärschlamm läßt sich nicht abschließend beurteilen, weil die Humanmedizin diese Virusfamilie erst zu entdecken beginnt. Es fehlt an Zahlen, mit denen die Durchseuchungsrate in der menschlichen Population zu belegen wäre. Einige Angaben liegen jedoch vor. So waren bei 70% der AIDS-Patienten mit Diarrhöe Antikörper gegen humane Parvoviren nachweisbar [2]. Auch ist schon festgestellt worden, daß der Mensch im Harn und im Stuhl Parvoviren ausscheiden kann [1, 2, 21]. Nach Williams sind Aggregate von Parvovirus-ähnlichen Partikeln in fäkal kontaminierten Abwässern zu erwarten [21]. Erst kürzlich haben Oliver und Phillip nachweisen können, daß es sich bei den "Small round viruses", die sich in Stuhlproben von Kindern mit Diarrhöe finden, wahrscheinlich um Parvoviren handelt [8]. Aufgrund dieser Angaben kann angenommen werden, daß Parvoviren eine hygienische Bedeutung in Abwässern und somit auch im Klärschlamm zukommt. Die Parvoviren wurden von uns jedoch in erster Linie ihrer hochgradigen Tenazität wegen in die Versuche einbezogen [14, 16, 20]. In dieser Beziehung geben sie ein gutes Indikatorvirus ab für das ebenfalls thermostabile meschliche Hepatitis-A-Virus [5, 9, 11].

Die getesteten Viren lassen sich in zwei Gruppen klassifizieren:

1. Thermostabile-chemolabile Viren (Parvoviren und Phage f2).
2. Thermolabile-chemostabile Viren (Rotaviren und Coxsackieviren).

Da es kein universales Indikatorvirus gibt, ist deshalb je nach Fragestellung ein Virus aus der betreffenden Gruppe auszuwählen.

Zum Schluß sei noch darauf hingewiesen, daß das beschriebene Sandwich-verfahren sich auch ganz allgemein für Virusinaktivierungsstudien in der Umwelt eignet. Es ist leicht vorstellbar, wenn auch noch nicht geprüft, daß das Verfahren auch für Inaktivierungsversuche mit Bakterien und Parasiteneiern zu verwenden wäre.

DANKSAGUNG

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt 4.621.0.85.07) und Herrn Keller, Betriebsleiter der ARA Altenrhein für die Förderung und tatkräftige Unterstützung der Arbeit sowie Fräulein Schafroth für die Sekretariatsarbeiten.

LITERATUR

1. Anderson, M.J., and Pattison, J.R.: The human parvovirus., Arch. Virol. 82 (1984), 137 - 148
2. Anderson, M.J., Higgins, P.G., Davis, L.R., Willman, J.S., Jones, S.E., Kidd, I.M., Pattison, J.R., and Tyrrell, D.A.J.: Experimental parvoviral infection in humans. J. Infect. Dis. 152 (1985), 257 - 265
3. Burge, W.D., Cramer, W.N., and Kawata, K.: Effect of heat on virus inactivation by ammonia. Appl. Environ. Microbiol. 45 (1983), 446 - 451
4. Cramer, W.N., Burge, W.D., and Kawata, K.: Kinetics of virus inactivation by ammonia. Appl. Environ. Microbiol. 45 (1983), 760 - 765
5. Hollinger, F.B.: Hepatitis A Virus. In: Virology (B.N. Fields, ed). 1380 - 1381, Raven-Press, New York (1985)
6. Knowlton, D.R., Ward, R.L.: Characterization of virucidal agents in activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987), 621 - 626
7. Koch, K., und Strauch, D.: Inaktivierung von Polio- und Parvovirus im Klärschlamm durch Kalkbehandlung. Zbl. Bakt. Hyg. B 174 (1981), 335 - 347
8. Oliver, O.D., and Phillips, A.D.: An electron microscopial investigation of faecal small round viruses. J. med. Virol. 24 (1988), 211 - 218
9. Patti, A.M., Santi, A.L., Gabrieli, R., Fiamma, S., Cauletti, M., and Pana, A.: Hepatitis A virus and poliovirus 1 inactivation in estuarine water. Wat. Res. 21 (1987), 1335 - 1338
10. Sato, K., Inaba, Y., Miura, S., Tokuhisa, S., and Matumoto, M.: Antigenic relationships between rotaviruses from different species as studied

by neutralization and immunofluorescence. Arch. Virology 73 (1982), 45 - 50

11. Siegl, G., Weitz, M., Kronauer, G.: Stability of hepatitis A virus. In: Intervirology 22 (1984), 218 - 226
12. Sobsey, M.D., and Jones, B.L.: Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. Appl. Environ. Microbiol. 37 (1979), 588 - 595
13. Spillmann, S.K., Traub, F., Schwyzer, M., and Wyler, R.: Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment. Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987), 2077 - 2081
14. Srivastava, R.N., and Lund, E.: The stability of bovine parvovirus and its possible use as an indicator for the persistence of enteric viruses. Water Res. 14 (1980), 1017 - 1021
15. Traub, F., Spillmann, S.K., and Wyler, R.: Method for determining virus inactivation during sludge treatment processes. Appl. Environ. Microbiol. 52 (1986), 498 - 503
16. Ur Rehman, S.: Untersuchungen zum viruziden Effekt bei der Erhitzung von Speiseabfällen für die Schweinemast. Tierärztl. Umschau 42 (1987), 892 - 897
17. Ward, R.L., and Ashley, C.S.: Discovery of an agent in wastewater sludge that reduces the heat required to inactivate reovirus. Appl. Environ. Microbiol. 34 (1977), 681 - 688
18. Ward, L.R., and Ashley, C.S.: Identification of detergents as components of wastewater sludge that modify the thermal stability of reovirus and enteroviruses. Appl. Environ. Microbiol. 36 (1978), 889 - 897
19. Ward, L.R., and Ashley, C.S.: Effects of wastewater sludge and its detergents on the stability of rotavirus. Appl. Environ. Microbiol. 39 (1980), 1154 - 1158
20. Wekerle, J., Leuze, M., Koch, K., and Strauch, D.: Untersuchungen zum Verhalten von Viren bei der konventionellen und der 2-stufigen anaerob-mesophilen Klärschlammstabilisierung mit Vor- und Nachpasteurisierung. Zbl. Bakt. Hyg. B 184 (1987), 214 - 228

21. Williams, F.P.: Membrane-associated viral complexes observed in stools and cell culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1985), 523 - 526
22. Wyler, R., Murbach, A., and Möhl, H.: An imidazole derivative (Econazole) as an antifungal agent in cell culture systems. *In Vitro* 15 (1979; 745 - 750

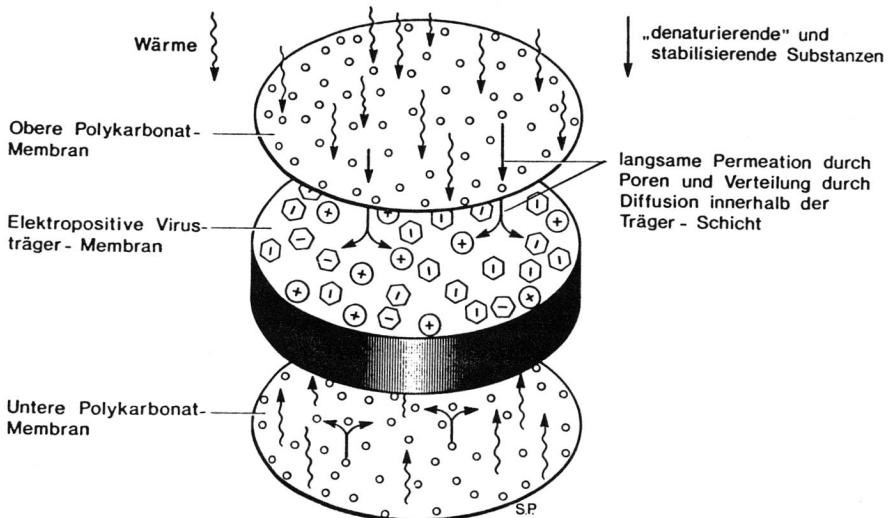


Abb. 1: Schematische Darstellung des Filter-Sandwichs. Die adsorbierten Viruspartikel sind sowohl der Wärme, als auch inaktivierenden und stabilisierenden Faktoren ausgesetzt

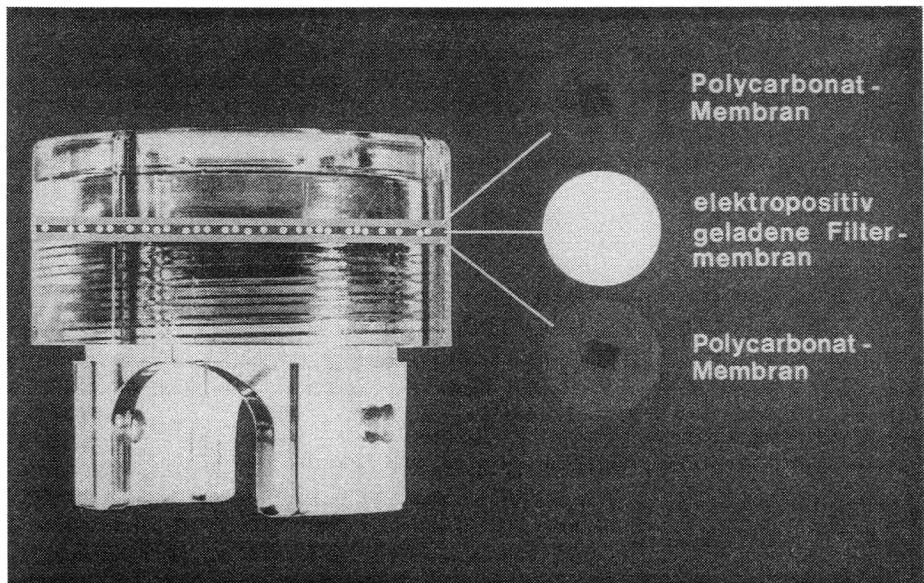


Abb. 2: Filterhalter mit eingeschraubtem Filter-Sandwich. Unten sind zwei Löcher sichtbar, mit denen die Filter am rostfreien Draht befestigt werden. Die in die obere und untere Abdeckung eingefrästen Öffnungen lassen sich nicht erkennen

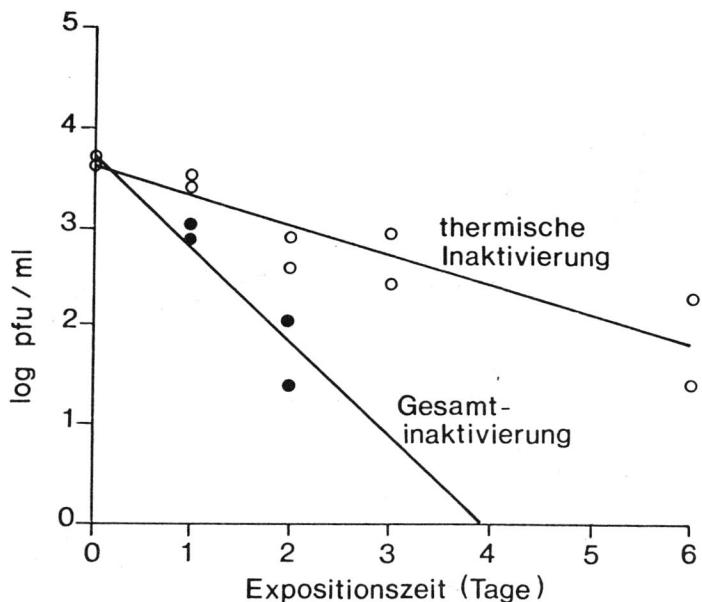


Abb. 3: Inaktivierung des bovinen Parvovirus während der anaerob mesophilen Faulung bei 36°C

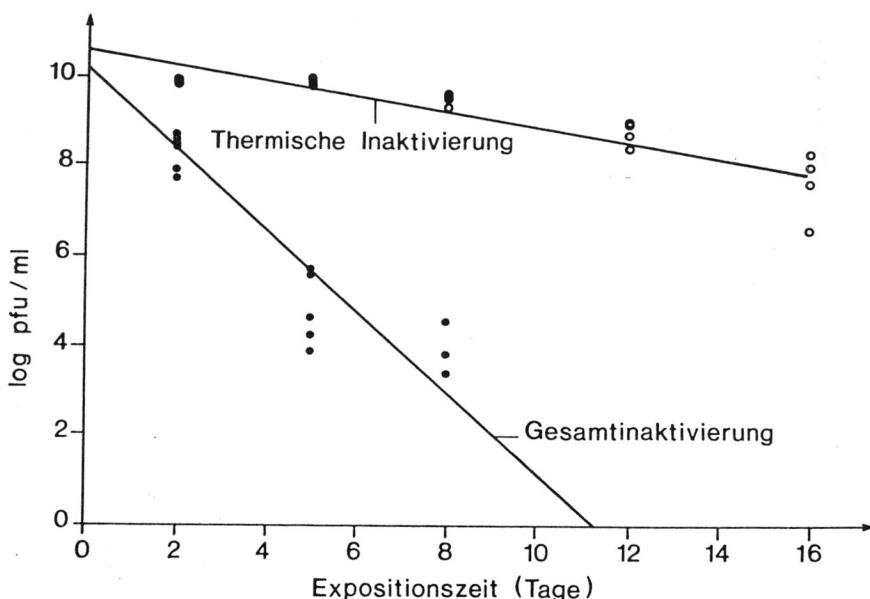


Abb. 4: Inaktivierung des Bakteriophagen f2 während der anaeroben mesophilen Faulung bei 34,5°C

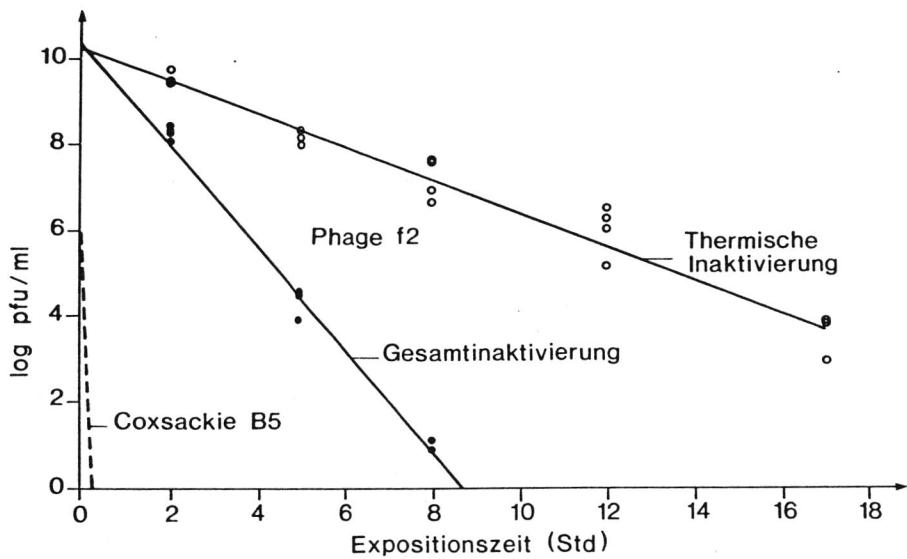


Abb. 5: Inaktivierung des Coxsackievirus B5 und des Bakteriophagen f2 während der anaerob thermophilen Faulung bei 54,5°C

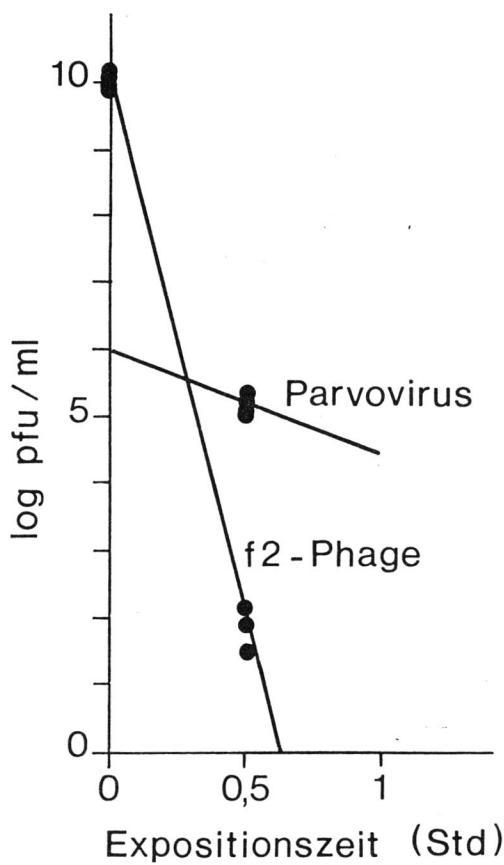


Abb. 6: Inaktivierung des Bakteriophagen f2 und des Parvovirus während der Vorpasteurisierung bei 70°C

Inaktivierung von Viren in Wasser und Desinfektion

H. Mahnel

ZUSAMMENFASSUNG

Die derzeitigen Erkenntnisse über Vorkommen, Bedeutung und Überlebensfähigkeit von Viren in Wasser sowie die Möglichkeiten einer wasserschonenden Desinfektion viraler Kontaminanten werden besprochen.

Die in das Wasser ausgeschiedenen, dort nicht vermehrungsfähigen Viren werden im Wasserkreislauf nicht nur stark verdünnt, sondern durch natürliche Umwelteinflüsse auch zunehmend inaktiviert. Unbehüllte Virusarten jedoch verhalten sich relativ wasserstabil. Für die künstliche Inaktivierung von Viren in Wasser und die Desinfektion sollte physikalischen Verfahren gegenüber chemischen Zusätzen der Vorzug gegeben werden. Geeignet sind die Wassererhitzung, kombinierte Filtrierverfahren und auch die UV-Bestrahlung. Wirksame viruzide Wirkstoffe, die die Wasserqualität nicht zu sehr nachteilig beeinflussen, sind Jod und freies Chlor, Ozon sowie einige Sauerstoff-abspaltende Verbindungen.

Wasser stellt für Mensch und Tiere das kostbarste Lebensmittel dar, ist es doch für den Stoffwechsel aller Lebewesen unersetzlich. Mit zunehmender Populationsdichte bei Menschen und Tieren wurde Wasser aber auch immer mehr zum Vektor, mit dem pathogene Mikroorganismen wie auch deren Toxine verbreitet werden können. Verseuchtes Wasser hat so immer wieder Explosionsepidemien ausgelöst. Viruskrankheiten aber, die auf kontaminiertes Wasser zurückzuführen waren, blieben im Vergleich zu bakteriellen Infektionen selbst in Gebieten mit niedrigem Hygienestandard selten, in zivilisierten Ländern sogar extrem selten [4, 5, 7, 11, 15].

Die relativ untergeordnete Rolle, die das Wasser im viralen Seuchengeschehen spielt, liegt in der Natur der Viren begründet. Als primäre Infektionsquel-

len und Reservoir für Viren fungieren ausschließlich belebte Organismen. Denn Viren vermehren sich nur in bestimmten, dafür empfänglichen lebenden Zellen, nie in der unbelebten Natur oder im Wasser. Sie können sich nie außerhalb von Organismen durch Vermehrung anreichern. Selbst Wasser, das durch menschliche oder tierische Ausscheidungen stark kontaminiert wurde, verliert vergleichsweise rasch an Infektiosität und Kontagiosität, weil mitgeführte Viren schnell sehr stark verdünnt und zusätzlich durch natürliche Umwelteinflüsse dezimiert werden. Aus der Abhängigkeit der viralen Wasserkontamination von infizierten Menschen und Tieren hat man die grobe Regel abgeleitet, daß in Wasser nachweisbare Viren die virologisch-epidemiologische Situation eines Gebietes wiederspiegeln.

VORKOMMEN VON VIREN IN WASSER

Von erkrankten oder nur infizierten Menschen oder Tieren ausgeschieden gelangen Viren überwiegend, z.T. massenhaft, in Abwässer, aber auch in Oberflächenwässer und weiter über Flüsse und Badeseen in Küstengewässer und Meere [17]. Über die Abwässer können sie sich auch in Klärschlamm und Böden sammeln und zum Teil auch das Grundwasser erreichen [11, 18]. Zumindest theoretisch ist über diesen Weg auch eine Verseuchung von Trinkwasser möglich (Abb. 1). In Abwasser-Kläranlagen, wie sie in zivilisierten Ländern gebräuchlich sind, werden die meisten Virusarten inaktiviert, bestimmte kleine unbehüllte Viren aber lediglich mehr oder weniger - je nach System - dezimiert [8, 25]. Abhängig von der Abwasserbelastung muß damit gerechnet werden, daß vor allem Enteroviren wie auch Parvoviren mit geklärten Abwässern in Flüsse übertreten.

In Grundwasser und Oberflächenwasser tritt eine extrem starke Verdünnung und auch eine Dezimierung der Viren durch Umwelteinflüsse hinzu. Die Wahrscheinlichkeit, daß Viren nach dem Wasserkreislauf im infektionstüchtigen Zustand ein Trinkwasser erreichen, empfängliche Wirte finden und am Ende in Konzentrationen vorliegen, die eine Infektionskrankheit auszulösen vermögen, ist sehr gering bis minimal.

In Trink- und Oberflächenwässern wurden bislang nur menschenpathogene Viren gesucht und nachgewiesen [Übersicht bei 14, 15]. Über tierpathogene Viren in Wässern fehlen jegliche Befunde. Die viralen Kontaminanten waren praktisch fast nur solche, die mit dem Kot massenhaft in hoher Konzentration ausgeschieden werden, unbehüllte kleine Viren, die als einzelne infektiöse Einheiten oder oft erst nach Konzentrationen von Proben aus mehreren Litern isoliert wurden. Es handelte sich fast nur um Erreger von Darminfektionen, überwiegend pathogen für Säuglinge oder Juvenile (vgl. Tab. 1). Man isolierte sie fast ausschließlich aus Oberflächenwässern.

Vielfach gefunden hat man humane Poliomyelitiviren in Oberflächenwässern, nachdem sie 1940 in Europa und USA als Kontaminanten erkannt worden waren. Nach Einführung der Impfung ließen sich anstelle des Wildvirus überwiegend nur mehr Impfstämme in Wasserproben nachweisen. Andere humane Enteroviren, wie Coxsackie- und Orphanviren, die nur als fakultativ pathogen gelten, haben weniger Bedeutung. Berichte über wasserbedingte Krankheitsausbrüche liegen insbesondere für Hepatitis A des Menschen vor. Sie stammen ausschließlich aus Gebieten mit sehr mangelhafter Abwasser- und Trinkwasserhygiene. Entweder war Abwasser in Trinkwasserquellen eingebrochen, die Trinkwassergewinnung stand unter zur starker Abwasserbelastung oder die Infektion erfolgte über den Genuss von nicht oder ungenügend aufbereitetem Fluß- oder Seewasser. Erfolgreich war der Virusnachweis aus Trink- oder Oberflächenwasser meistens in Gebieten mit starker endemischer Verseuchung durch ein Virus, z.B. nach Epidemien (Hepatitis A, Poliomyelitis, Coxsackie-Infektionen) oder nach Impfaktionen (Poliomyelitis-Impfstämme). Ähnliche Verhältnisse sind sicher auch für tierpathogene Viren zu erwarten, obwohl diese Viren bisher nicht gesucht wurden (Picornaviren, Parvoviren, Rotaviren u.a.).

Ein ätiologisch geklärter Zusammenhang zwischen dem Wassergenuß und der Erkrankung wurde allerdings bis jetzt nur bei der Hepatitis A und der Poliomyelitis gesichert. Für andere Isolate ist nicht erwiesen, daß sie Infektionen auszulösen vermochten. Wie auch die Unklarheit über tierpathogene Viren liegt dies sicher im bisher geringen Interesse an virologischen Wasseruntersuchungen und der Problematik empfindlicher Nachweisverfahren begründet.

TENAZITÄT UND NATÜRLICHE INAKTIVIERUNG DER VIREN IN WASSER

Die Widerstandsfähigkeit der Viren generell wie auch die in Wasser ist je nach Aufbau eines Virus sehr unterschiedlich. Im allgemeinen sind kleine unbehüllte Virusarten wesentlich widerstandsfähiger einzuschätzen als mittelgroße bis große behüllte. Auch bei in Wasser suspendierten Viren hat sich dies bestätigt. Schon vor Jahren haben wir in breiteren Untersuchungen diese Differenzen festgestellt [12]. Picorna- bzw. Enteroviren, Parvoviren und Reo-Rotaviren halten sich in Trink- und Oberflächenwässern lange infektiös (Tab. 2). Die Pockenviren sind ebenso stabil, haben aber keine Bedeutung als Wasserkontaminanten. Viren werden überwiegend selbst im kalten Wasser mehr oder weniger stark dezimiert. Die bisher vorliegenden Untersuchungen an Trink- und Oberflächenwässern bestätigen diese Gruppierung. Aus Fluß- und Binnenseewasser sind überwiegend Enteroviren, gelegentlich auch Rotaviren, in Badewässern auch Adenoviren isoliert worden. In Trinkwasser aber finden sich diese Viren nur in Gebieten mit mangelhafter Trinkwasserhygiene (Tab. 3).

Bei der natürlichen Inaktivierung von Viren im Wasserkreislauf spielen eine Reihe von Faktoren eine mehr oder weniger bedeutsame Rolle [12, 14, 26].

In erster Linie virusaktivierend wirken nach den publizierten Untersuchungen und eigenen Erkenntnissen neben der Temperatur, sie vor allem in wärmeren Gegenden und Jahreszeiten, die Sauerstoff- und Lichteinflüsse, die alle Virusarten mehr oder weniger schädigen können. UV-Strahlen vermögen zwar nicht tief in Wasser einzudringen, an der Oberfläche aber wirken sie rasch und intensiv. Wesentlich dürfte auch das Zusammenwirken der genannten Einflüsse sein. Frisches natürliches Wasser scheint an sich eine gewisse Viruzidie zu besitzen. Dabei wird eine Beziehung zwischen der viruziden Potenz eines Oberflächenwassers zum Gehalt an Mikroorganismen mit Zellstruktur vermutet. In keimfreiem Wasser war in entsprechenden Naturversuchen die Virusaktivierung wesentlich schwächer ausgeprägt. In neuerer Zeit fanden sich ferner Anhaltspunkte, daß in keimhaltigem Oberflächenwasser bakterielle Enzyme zur Inaktivierung beitragen [26]. Auch gegenteilige Vermutungen existieren. Viren binden sich bevorzugt an größere Partikel, auch z.B. an Bakterien, und können dadurch stabilisiert werden [14].

Viruzid wirkende pH-Werte unter 6 und über 9 sind im Wasser kaum anzutreffen. Eliminiert werden Viren im natürlichen Wasserkreislauf aber auch durch Adsorptionseffekte. Die Viruspartikel werden in Boden und Schlamm festgehalten, können sich dort anreichern und je nach Tenazität auch halten, wodurch das Wasser stark an Virusgehalt verliert. Bei der Bodenfiltration wird der Eliminierungseffekt auf 99 - 99,99% veranschlagt [18]. Aus der Abbildung 2 werden die natürlichen Effekte auf Viren im Wasserkreislauf ersichtlich.

Die natürlichen Inaktivierungsprozesse bewirken, daß z.B. in Flußwässern auf 1 bis 10 Liter Wasser mit maximal einer infektiösen Viruseinheit zu rechnen ist. Nach der Passage von Städten und Dörfern können zwar kurzfristig 10- bis 100-fach mehr Viren enthalten sein, sie werden aber rasch wieder ausverdünnt. In Süßwasser ist mit ähnlichen Relationen zu rechnen. Trinkwasser in zivilisierten Gebieten enthält nachweislich nur etwa 1 Viruspartikel pro cbm oder noch weniger.

KÜNSTLICHE INAKTIVIERUNG UND DESINFektION VON VIREN IN WASSER

Vor Überlegungen über eine künstliche Inaktivierung bzw. Desinfektion viruskontaminiert Wässer, die unter natürlichen Verhältnissen für den menschlichen und tierischen Genuss in Betracht kommen, sei es ein Oberflächenwasser oder ein hygienisch bedenkliches Trinkwasser, darf man also davon ausgehen, daß nur wenige infektiöse Viruseinheiten pro Liter Wasser zu eliminieren sind. Eigene und experimentelle Ergebnisse anderer Untersucher über eine künstliche Inaktivierung von Viren in Wasser wurden dagegen durchgehend an Wasserproben gewonnen, die gegenüber Feldverhältnissen 100- bis 1000-fach mehr Viren enthielten. Die experimentellen Erkenntnisse sind deshalb zuverlässig und bergen einen beträchtlichen Sicherheitsfaktor.

Umweltfreundlich und zu begrüßen sind zweifellos nur physikalische Inaktivierungsmittel, an erster Stelle die Erhitzung des Wassers. Für fast alle Viren ist eine Temperatur von 60 - 70°C kritisch [10, 11, 19]. Ausgesprochen wärmeableible Viren werden bei 60°C schon in 5 min, die stabilieren in 15 bis 30 min restlos inaktiviert. Bei der Kurzzeiterhitzung sind 70°C zu empfehlen, wo maximal 5 min ausreichen. Eine Ausnahme hinsichtlich der Thermostabilität stellen aber die vorerst nur für die Veterinärmedizin wichtigen Parvoviren dar, die sich erst ab 90°C zuverlässig in praktikabler Zeit inaktivieren lassen (Tab. 4).

Ein effektives, jedoch weniger praktisches Verfahren ist die UV-Bestrahlung von Wasser in geeigneten Anlagen für kleinere bis mittlere Wassermengen [2]. Üblicherweise durch Filtration vorgeklärtes Wasser wird in dünner Schicht von maximal 1 cm um eine starke UV-Strahlenquelle, evtl. mit Außenreflektoren, geleitet. Die Durchflußgeschwindigkeit des Wassers ist so zu regulieren, daß die UV-Strahlen die zur Inaktivierung erforderliche Zeit einwirken können. Die UV-Transmission des Wassers muß dabei über 30% erreichen und eine Dosis von 1 Watt pro 100 Liter einwirken. Das Verfahren ist zuverlässig, solange diese Geräte sauber gehalten werden. Schon eine geringe Verschmutzung stellt die nur oberflächlich gute Wirksamkeit der UV-Strahlen in Frage. Rein mechanisch, ohne chemische Zusätze, lassen sich Viren aus Wasser auch über Kombinationen aus Filtern (Sandfilter, Kohlefilter) und der Umkehrsmose eliminieren. Anlagen dieser Art sind für den militärischen Feldeinsatz konstruiert worden [9]. Auch sie arbeiten aber nur so lange zuverlässig, als die Filter nicht erschöpft und die Umkehrsmose-Einheiten dicht sind, d.h. nicht als Folge bakterieller Kontamination Poren entstehen, die Viren durchlassen.

Von den chemischen Wirkstoffen, die Viren zuverlässig inaktivieren, kommen für die Trinkwasserdesinfektion nur solche in Frage, die in wirksamen Konzentrationen die Genußtauglichkeit und Unschädlichkeit des Wassers nicht oder nur wenig beeinträchtigen. Zwei Wirkstoffgruppen können diesen Anforderungen nur gerecht werden, Halogenverbindungen oder Oxidantien. Bei der Anwendung solcher Mittel muß differenziert werden zwischen Methoden, die für die öffentlichen Trinkwassersysteme in Betracht kommen, und Möglichkeiten für kleine Wassermengen zur Desinfektion unter Feldverhältnissen, z.B. für Touristen und Soldaten. Eine dritte Zielrichtung ist die Herstellung einer Viruzidie bei der Vorratshaltung von Wasser, beispielsweise auf Schiffen.

In eigenen Versuchen haben wir geprüft, welche chemischen Zusätze für die Virusinaktivierung in kleinen Wassermengen von etwa 10 Litern geeignet sind, und neben allgemeingebräuchlichen Wirkstoffen auch eine Reihe von Mitteln mit potentieller Viruzidie, wie Sauerstoff-Abspalter, Säuren und Persäuren, einbezogen [10]. Nur wenige Zusätze haben das Wasser in seiner Genießbarkeit nicht verdorben. Ein Auszug aus den Ergebnissen enthält die Tabelle 5. Von den Chlorverbindungen scheint allenfalls freies Chlor geeignet [4, 10, 16, 20, 22]. Um Enteroviren zuverlässig zu inaktivieren (Hepatitis A, Poliomyelitis) ist jedoch eine Konzentration notwendig, die an der Grenze der Genießbarkeit des Was-

sers liegt. Überwiegend wird für die viruswirksame Chlorung von Trinkwasser ein Gehalt von 0,2 bis 0,5 mg/Liter freiem Chlor (Restchlor), je nach Reinheit des Wassers, für ausreichend erachtet, aber auch 0,5 bis 1 mg/Liter und 1 Stunde Einwirkung bei Temperaturen über 4°C empfohlen [16, 20, 22, 23]. Gebundenes Chlor ist ungeeignet. Ein Wasser mit ausreichender Wirkstoffmenge ist ungenießbar. Jodzusätze erwiesen sich als günstiger [10]. Geschmacklich tritt der Wirkstoff zwar deutlich in Erscheinung, das Wasser bleibt aber noch trinkbar. Jod wird deshalb in Form von Tabletten zur Trinkwasserdesinfektion unter Feldverhältnissen (Militär) verwendet [1, 3]. Unter einigen Oxidantien erwies sich nur das Kaliumpermanganat als bedingt geeignet, auch die Peressigsäure. Sie wirkt in reinem Wasser zuverlässig rasch und säuert nicht unangenehm. Eine Reihe wenig resistenter behüllter Virusarten wird im Wasser schon durch Zugabe von 1 - 2% reiner Zitronensäure in 5 min inaktiviert.

Für die Prophylaxe in Trinkwassertanks empfiehlt sich die Chlorung rechtzeitig vor dem Genuß, denn der Chlorgeschmack soll später weitgehend verflogen sein. In unseren Prüfungen bewährt hat sich aber auch ein Kombinationspräparat, das kolloidales Silber und Wasserstoffperoxid zu etwa gleichen Teilen enthielt [13]. Allerdings muß der Zusatz mindestens einen Tag einwirken, damit auch kritische Viren zuverlässig inaktiviert werden. Das Wasser bleibt geschmacklich einwandfrei.

Für öffentliche Trinkwasserversorgungssysteme wirken die herkömmlichen Verfahren der Chlorung und der Ozonierung ausreichend viruzid. Die Ozonierung in der gebräuchlichen Stärke ist dabei insofern von Vorteil, als sie auf Viren einheitlicher und besser wirkt [6, 16, 22, 23, 24]. Ozonkonzentrationen von etwa 0,2 mg pro Liter, wie sie für die üblichen Keimarten des Wassers zur Abtötung empfohlen werden, erfassen Enteroviren und Rotaviren geringer Zahl ebenfalls zuverlässig. Dagegen muß zur Inaktivierung der wichtigen Enteroviren eine Menge an freiem Chlor in Trinkwasser vorliegen, die einer starken bakteriellen Wasserkontamination gerecht würde. Ein solches Trinkwasser ist dann für den menschlichen Genuß wegen des Chlorgeschmacks auf die Dauer kaum akzeptabel.

Aus den bisher gewonnenen wasservirologischen Erkenntnissen läßt sich heute durchaus die Frage beantworten, ob und wann ein für den menschlichen oder tierischen Genuß vorgesehenes Wasser gezielt auf Viruskontaminanten desinfiziert werden sollte. Für zivilisierte Länder liegen keinerlei Beweise vor, daß Viren in Wasser, welches den geltenden bakteriologischen Anforderungen genügt, zu befürchten sind oder gar Krankheiten damit ausgelöst werden könnten. Die Hygienestandards, die sich an den Fäkalkeimen orientieren, genügen durchaus auch für die fast ausschließlich mit dem Kot ins Wasser ausgeschiedenen Viren. Auf diese wasserhygienischen Richtwerte sollte allerdings auch bei der Versorgung von Tieren mit Trink- oder Oberflächenwasser geachtet werden. Nur Wasser zweifelhafter Herkunft und Hygiene kann für Mensch und Tiere relevante Viren in infektionstüchtiger Menge enthalten, die dann bevorzugt mit physikalischen Methoden inaktiviert werden sollten.

LITERATUR

1. Berg, G., Chang, S.L., and Harries, E.K.: Devitalization of microorganisms by iodination. *Virology* 22 (1964), 469 - 481
2. Brodorotti, St.H. von und Mahnel, H.: Vergleichende Untersuchungen zur UV-Empfindlichkeit von Viren. *Zbl. Vet. Med. B* 29 (1982), 129 - 136
3. Chang, S.L.: The use of active iodine as a water disinfectant. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 47 (1958), 417 - 423
4. Chang, S.L.: Waterborne viral infections and their prevention. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 38 (1968), 401 - 414
5. Clarke, N.A., and Chang, S.L.: Enteric viruses in water. *J. Amer. Water Works Ass.* 51 (1959), 1299 - 1317
6. Coun, L., Hannoun, C., et Gomella, C.: Inactivation par l'ozone du virus de la poliomyélite présent dans les eaux. *Presse Med.* 37 (1964), 2154 - 2158
7. Craun, G.F., and McCabe, L.J.: Review of the causes of water-borne-disease outbreaks. *J. Amer. Water Works Ass.* 65 (1973), 74 - 84
8. Grabow, W.O.K.: The virology of waste water treatment. *Water Research* 2 (1968), 675 - 701
9. Hinterberger, J., Streubel, U. und Sprockhoff, H.v.: Zur Technologie der Trinkwasserentkeimung für Zwecke der Bundeswehr. *gwf-wasser/abwasser* 122 (1981), 190 - 200
10. Mahnel, H.: Untersuchungen zur Virusaktivierung in Trink- und Oberflächenwasser. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 165 (1977), 527 - 538
11. Mahnel, H.: Virusbedingte Risiken bei Tränk- und Brauchwasser und Vorschläge für Standards. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 93 (1986), 292 - 294
12. Mahnel, H., Ottis, K. und Herlyn, M.: Stabilität von 9 Virusarten unterschiedlicher Genera in Trink- und Oberflächenwasser. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 164 (1977), 64 - 84

13. Mahnel, H. und Schmidt, M.: Über die Wirkung von Silberverbindungen auf Viren in Wasser. Zbl. Bakt. Hyg. B 182 (1986), 381 - 392
14. Melnick, J.L.: Water as a reservoir of virus in nature and means for control. In: Virus and environment; Academic Press, New York-San Francisco-London 1978
15. Melnick, J.L., Gerba, C.P., and Wallis, C.: Viruses in water. Bull. Wld. Hlth. Org. 56 (1978), 499 - 508
16. Morris, J.D.: Chlorination and disinfection. J. Amer. Water Works Ass. 63 (1971), 769 - 775
17. O'Brien, R.T., and Newman, J.S.: Inactivation of polioviruses and coxsackieviruses in surface water. Appl. Environ. Microbiol. 33 (1977), 334 - 340
18. Rao, V.Ch., Metcalf, T.G., and Melnick, J.L.: Human viruses in sediments, sludges and soils. Bull. Wld. Hlth Org. 64 (1986), 1 - 14
19. Rehman, S.u.r.: Untersuchungen zum viruziden Effekt bei der Erhitzung von Speiseabfällen für die Schweinemast. Tierärztl. Umschau 42 (1987), 892 - 897
20. Scarpino, P.V., Berg, G., Chang, S.L., Dahling, D., and Lucas, M.: A comparative study of the inactivation of viruses in water by chlorine. Water Research (Pergamon Press) 6 (1972), 959 - 965
21. Spillmann, St.K., Traub, F., Schwyzer, M., and Wyler, R.: Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment. Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987) 2077 - 2081
22. Thraenhart, C., und Kuwert, E.: Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Chlor und Ozon auf Polioviren bei der Trinkwasseraufbereitung der Stadt Essen. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 160 (1975), 305 - 341
23. Vaughn, J.M., Chen, Y.S., Lindburg, K., and Morales, D.: Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 51 (1986), 391 - 394

24. Vaughn, J.M., Chen, Y.S., Lindburg, K., and Morales, D.: Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987), 2218 - 2221
25. Walter, R.: Eliminationsmöglichkeiten von Viren in Kläranlagen. *Wasser und Abwasser* 24 (1981), 161 - 182
26. Ward, R.L., Knowlton, D.R., and Winston, P.E.: Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (1986), 450 - 459

Tab. 1: Infektiosität und Pathogenität wichtiger wasserrelevanter Viren

Gruppe	Virus (Krankheit)	Infektiostät	Pathogenität	Tenazität (Wasser)
Picorna	Polio, Coxsackie (Mensch)	hoch	mäßig	hoch
	Hepatitis A (Mensch)	hoch	hoch	hoch
	Vesikulärkrankheit (Schwein)	hoch	hoch	hoch
	MKS (Wiederkäuer etc.)	hoch	hoch	sehr gering
Calici	humane Calici (Gastroenteritis)	hoch	unter-* schiedl.	hoch
Reo	Reo (Mensch, Tiere)	gering	fakultativ	gering
	Rota (Mensch, Tiere)	mittel	unter-* schiedl.	mäßig
Toga	MD-BVD (Rind)	hoch	hoch	sehr gering
	Europ. Schweinepest	hoch	hoch	sehr gering
Paramyxo	Newcastle Disease (Gefl.)	hoch	unter-* schiedl.	mäßig
	Staupe (Hund)	hoch	hoch	mäßig
Corona	TGE, FIP (Schwein, Katze)	hoch	hoch	sehr gering
	sonstige Corona	hoch	unter-* schiedl.	sehr gering
Parvo	Parvovirosen (Schw., Hd., Ktz.)	hoch	hoch	sehr hoch
Adeno	HCC (Hund)	hoch	hoch	hoch
Herpes	IBR-IPV, Aujeszky u.a.	hoch	hoch	sehr gering

* = hoch nur für Säuglinge und Juvenile bzw. verschieden virulente Stämme

Tab. 2: Stabilität unterschiedlicher Virusarten in Trink- und Oberflächenwasser;
Abfall des Virusgehalts um 99% in Tagen (im Kanister mit 10 Litern,
lichtgeschützt)

Virusfamilie	geprüfte Virusart	Wassertemperatur	
		9 °C	15 °C
Parvo	bovin. Parvo	> 200	> 200
Picorna (Ent.)	Teschen	> 200	> 200
Pox	Vaccina	200	200
Reo	Reo I, Rota	175	n.d.
<hr/>			
Adeno	HCC	130	100
Paramyxo	NDV	110	60
<hr/>			
Corona	TGE	40	n.d.
Picorna (Aph)	MKS	40	n.d.
Herpes	Aujeszky	20 - 40	10 - 20
Rhabdo	Vesikül.Stomatitis	20 - 30	n.d.
Toga	Sindbis	10 - 20	n.d.

Tab. 3: In Wasser nachgewiesene oder wahrscheinliche Virusarten

Virus-familie	Virusarten	Vorkommen in			Richtwerte* für	
		Abw	Oflw	Trw	Wässer kühl	(Monate) lau
Picorna	Polioviren	+++	++	(+)	3-6	2-4
	Orphanviren	+++	++	(+)		
	Coxsackieviren	++	+	-		
	Hepatitis A-Viren	+	+	(+)		
	sonst. Enteroviren	+	?	?		
Reo	Reoviren	+	+	-	3-6	2-4
	Rotaviren	++	+	-		
Parvo	Parvoviren	+	+	-	4-6	3-4
Adeno	Adenoviren	+	+	+	2-4	2-3
Papova	Vacuolating-Viren	+	?	-	?	?
Paramyxo	Parainfluenza-Viren	+	+	-	1-3	1-2
Corona	Coronaviren	+	-	-	ca. 2 Wo	Tage?

() = nur in Gebieten mit mangelhafter Trinkwasserhygiene

* = anhand eigener Befunde

Tab. 4: Thermoaktivierung von Viren in Trinkwasser; restlose Inaktivierung von 10^4 KID₅₀/ml Wasser in min

Virus-familie	Testvirus	60°	Temperatur		Bedeutung
			70°	80°	
Parvo	bovinus Parvo*	60	30 - 40	45 - 60	: Tiere
Reo	Reo I	30	2 - 5	n.d.	: Rota, Mensch, Tiere
Adeno	Hepatitis cont.canis	15	2 - 5	1	gering
Pocken	Vaccinia	15	2 - 5	1	keine
Paramyxo	Newcastle Disease	15	5	1	: Tier
Corona	TGE	15	2 - 5	1	: Tier
Picorna	bovinus Enterovirus	5	1 - 2	1	keine
	Polio I	5	1 - 2	1	: Mensch Hepatitis A
Herpes	Aujeszky	5	1 - 2	1	keine

* bei 90°C in 15 min

Tab. 5: Wirkstoffmengen (mg/L) die in 15 min bei 22°C 10^3 bis 10^4 KID₅₀ inaktivieren

Wirkstoff	Mittel	bovin. Parvo	ECBO attenu.	canin. Adeno	Reo I	NDV	Vacci- nia	maximal genießbar
Jod	gesätt. Jodlösung	10	10	3	3	1	1	30 (100)
	Lugolsche Lösung (5% Jod)	10	10	3	3	1	1	
	Ca-Hypochlorit	10	10	3	3	3	3	
Chlor, frei Chlor, gebunden	Chloramin-T	300	300	300	300	100	100	30
	KMnO ₄	100	100	30	10	50	50	100
	H ₂ O ₂	3000	1000	3000	1000	1000	1000	300
Oxydans	P 15 mit 33% Ethanol	5	4	2	2	2	2	10
	Sanosil 25-T	n.d.	50	n.d.	n.d.	100	30	500
kolloid. Silber mit 50% H ₂ O ₂ *								

* = bei 24 Stunden Einwirkungszeit

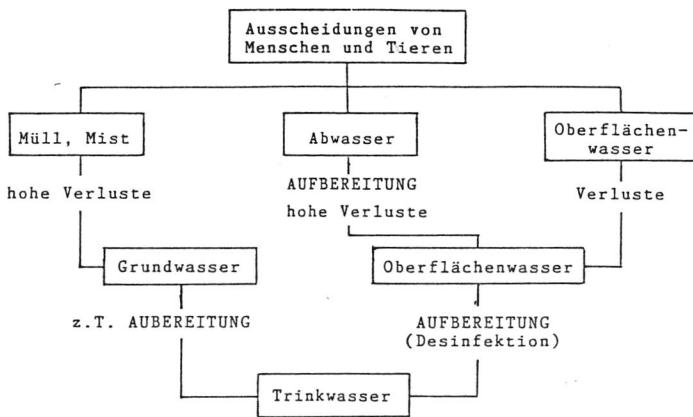


Abbildung 1: Verbreitung von Viren durch Wasser

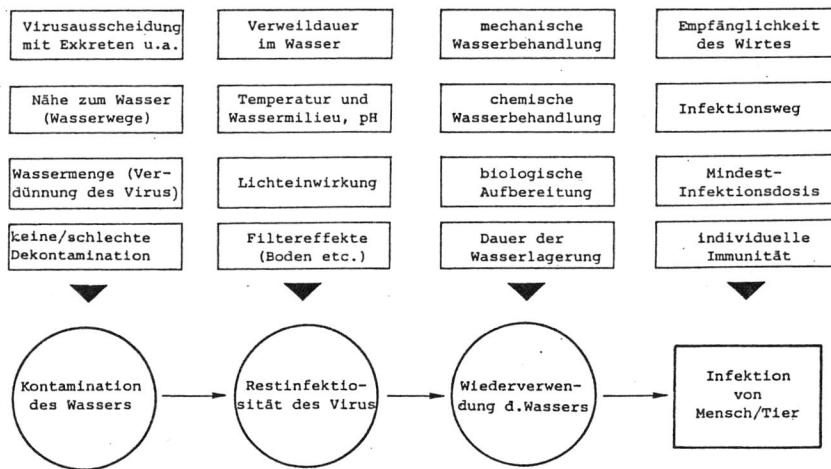


Abbildung 2: Beinflussung von Infektiosität und Übertragung der Viren durch den Wasserkreislauf

Diskussion III

Obst: Wir haben eine Fülle von Untersuchungsergebnissen gehört, aber der Mangel an entscheidenden Informationen zog sich wie ein roter Faden durch das Programm. Das ist sicher darauf zurückzuführen, daß die Untersuchungen doch sehr kompliziert und aufwendig sind, zumindest für einen üblichen Praktiker, auch wenn er ein noch so gutes Labor hat. Herr Lopez Pila hat mir aus der Seele gesprochen als er auf zukünftige Methoden und Entwicklungen hinwies und ich möchte das mit Nachdruck unterstreichen, weil hier eine große Zahl hochgradiger Fachleute sitzt. Es gibt doch einige Dinge im klinischen Bereich der Medizin von monoklonalen Antikörpern bis Gensonden, die sich sicher mit einiger Mühe auch im Umweltbereich anwenden lassen, eventuell in Kombination mit Konzentrierungsverfahren, die Herr Hahn angesprochen hat, oder mit sonstigen Kulturverfahren. Wir brauchen viele Untersuchungen und Analysenmethoden, damit wir diesen ganzen Ring noch einmal schließen können.

Lopez Pila: Zweifellos, das Indikatorproblem ist nicht gelöst, lassen Sie mich das von vornherein sagen. Hinsichtlich der monoklonalen Antikörper sehe ich noch keinen Silberstreifen am Horizont. Ich sehe eine Möglichkeit mit Gensonden, allerdings nicht wenn sie radioaktiv markiert sind, denn welchem Wasserlabor würden Sie zumuten, radioaktiv zu arbeiten. Aber es gibt ja die Möglichkeit, nicht-radioaktive Gensonden zu benutzen. Das wäre ein Durchbruch, weil man mit einer geeigneten Gensonde alle 72 Enteroviren auf einmal nachweisen könnte. Bakteriophagen können gut und bequem in jedem mittleren Labor eines Wasserwerkes bestimmt werden. Sie eignen sich sicherlich gut, um die Eliminationsleistung von Anlagen zu beurteilen. Ob sie sich als Virenindikator eignen, ist fraglich; Herr Hahn hat ja Enteroviren gefunden, jedoch keine Bakteriophagen.

Jung: Frage an Herrn Hahn: Welches Wirtssystem haben sie verwendet?

Hahn: Das war E.coli-C und ATCC 13706 nach der Methode von Grabow. Es ist mir schon klar, daß die Methodenangaben in meinem Vortrag nicht vollständig waren.

Jung: Sie werden mehrere Wirtssysteme verwenden müssen, um möglichst viele Coliphagen zu erfassen, weil diese sich in ihrem Transportverhalten erheblich unterscheiden und die Wirtsbereiche unterschiedlich sind. Sie werden also die T-Phagen nur mit einem bestimmten System nachweisen, mit dem System B. Sie werden aber kaum die DNS-Phagen auf dem K 12-Stamm finden. Hier müßte man verschiedene Wirtssysteme anwenden, bevor man über Phagen etwas sagen kann.

Klein: Das kennzeichnet ja noch einmal die Schwierigkeit, Zahlen aus unterschiedlichen Untersuchungen schlicht zu vergleichen. Methoden für eine hygienisch relevante Phagenbestimmung sind offenbar noch ein besonders schwieriges Kapitel.

Mahnel: Ich weiß nicht, warum sich alles immer so auf methodische Fragen stützt. Ich meine: Wo man das Wasser untersuchen muß, kann man mit bakteriellen Indikatoren prüfen. Bei potentiell Trinkwasser wird man auch virale Kontaminationen überprüfen müssen, und das sollte in einem zentralen Labor geschehen, das technisch hochwertig ausgerüstet ist. Es sind monoklonale Antikörper und andere Verfahren angeklungen, aber nur erstklassige LABs können solche Untersuchungen machen. Die können dann sagen: Wir haben ein paar Wässer, die verdächtig sind, und die werden wir richtig untersuchen. Aber daß jedes Amt untersucht und Indikatorforschung betreibt, halte ich nicht für sinnvoll.

Klein: Da gibt es sicherlich noch unterschiedliche Auffassungen. Wenn ich Herrn Althaus oder Herrn Jung die Aufgabe stelle, 450.000 Einzelwasserversorgungen in der Bundesrepublik zu untersuchen, dann würden sie sich bestimmt freuen. Die Entstehungsbedingungen von Trinkwasser sind doch sehr unterschiedlich und insofern muß unser Augenmerk darauf gerichtet sein, die Entstehungsbedingungen und die Kontaminationsbedingungen überhaupt erst einmal zu untersuchen. Erst dann können wir sagen: wenn Trinkwasser so und so entsteht, ist es virusfrei. Das haben wir mit den Bakterien einigermaßen gut bewältigt, bei den Viren tappen wir noch erheblich im Dunkeln.

Weber, Wien: Eine Frage an Herrn Hahn: Sie haben heute gesagt, daß man trotz Ozonung Viren gefunden hat. Wie hoch war die Ozonkonzentration, wie lang war die Einwirkungszeit?

Hahn: Diese Dinge wollten wir auch herausbekommen, die hängen zusammen mit dem Problem der Wartung von Anlagen. Es konnte uns nicht definitiv gesagt werden, welche Ozonmenge zur desinfizierenden Wirkung im Wasserwerk verwendet wurde. Es tut mir leid, wir haben es versucht, aber wir konnten es nicht herausbekommen.

Allgemeine Diskussion des ersten Tages: Viren im Wasserkreislauf

Klein: Der Arbeitsbereich, mit dem wir uns heute beschäftigt haben, ist das Gewässer mit seinen verschiedenen Berührungs punkten Grundwasser, Trinkwasser, Abwasser und Einleitung von Abwasser in die Gewässer. Wichtig war uns der Aspekt, was Viren uns dort an Informationen geben, wie sie sich verhalten und was wir darüber aussagen können. Wir haben zunächst also ein System, das für uns aus der Sicht der Trinkwasserhygiene beschreibt, wie und unter welchen Bedingungen der Kreislauf zwischen Abwasser und Trinkwasser geschlossen wird, welche Mechanismen wirksam sind und welche Reaktionsprozesse dafür sorgen, daß aus Abwasser und Gewässern Trinkwasser in einer unproblematischen Beschaffenheit werden kann. Hier beschäftigt uns also die Frage nach den Wegen, dem Verhalten von Viren und ihrem Vorkommen. Wir haben gehört, daß ganz entscheidend für den Aktivitätsprozeß im Wasserkreislauf natürlich die Aufnahme, der Konsum des Wassers durch den Menschen, die Vermehrung der Viren im Menschen und als dicker Pfad die Ausscheidung ins Abwasser und die Freisetzung im Abwasser darstellt. Wir haben gehört, daß es kurzgeschlossene Kreisläufe gibt, wo also ohne Kläranlage direkte Infektion erfolgen kann. Die Klärschlammproblematik ist diskutiert worden, wobei wir uns über Reaktionszeiten und Aufenthaltszeiten die Antworten erarbeiten müssen. Insbesondere interessiert natürlich im Zusammenhang mit den traditionell mikrobiologisch begründeten Schutzzonen, die Aufenthaltszeiten von 50 Tagen sicherstellen, inwieweit die hier vorgestellten Überlebenszeiten, die deutlich über 50 Tagen für manche Viren liegen, bei der Sicherung der Trinkwasserversorgung zufriedenstellend für uns sind. Bevor wir eine Bewertung vornehmen können, kommt natürlich die ganz entscheidende Frage nach der Infektion. Wir haben auf der anderen Seite das völlig ungeklärte Areal Viehhaltung, Behandlung von Abwässern aus der Viehhaltung oder von Abgängen aus der Viehhaltung. Außerdem haben wir gehört, daß die Akkumulation von Viren in z.B. Muscheltieren mit Sicherheit zu Infektionen führen kann. Daneben ist selbstverständlich der Bereich Baden und Schwimmen wichtig. Ich möchte darauf hinweisen, wie wenig von dem, was an diesen Bereichen interessiert, überhaupt schon geklärt ist bzw. wo wir überhaupt grundlegende Informationen zum Verhalten der Viren vorfinden.

Lopez Pila: Herr Prof. Habermehl hat uns deutlich gezeigt, wie Vireninfektionen zur Zerstörung von Zellen führen. Herr Prof. Shuval hat uns überrascht mit der Mitteilung, daß an der amerikanischen Ostküste jeder vierte Hepatitisfall - nicht jeder epidemische Hepatitisfall, sondern jeder endemische Hepatitisfall, d.h. jeder einzelne ohne Zusammenhänge mit anderen beobachtete Fall - durch Verzehr von rohen Muscheln oder Austern entsteht. Er hat

uns auch klargemacht, daß das Fehlen von epidemischen Ausbrüchen eine eindeutige Verfolgung von Kontaminationen mit dem Mittel der Epidemiologie sehr schwierig macht. Herr Dr. Wekerle führte uns sehr deutlich vor Augen, welche Mengen und Vielfalt an tierischen Viren in die Umwelt gelangen. Ich selbst habe versucht, die Leistung der Abwasserklärung, wie sie heute in Mitteleuropa besteht, zu würdigen, aber auch zu zeigen, was diesbezüglich noch getan werden müßte. Herr Dizer hat uns über die Adsorptionseigenschaften von Sandfiltern berichtet und, was noch wichtiger ist, er hat uns die Anfälligkeit von Filtern gegenüber organischen Verunreinigungen (Tensiden) vorgeführt. Herr Prof. Wyler hat uns sehr wertvolle Verfahren bei der Bestimmung der Virenaktivierung in Schlamm mitgeteilt. Ich bin sicher, daß das von großer Wichtigkeit sein wird bei der Schlammhygienisierung. Schließlich hat uns Prof. Mahnel gezeigt, wie Viren mit Desinfektionsmitteln inaktiviert werden können; er hat aber auch gezeigt, wie resistent Viren manchmal sein können. Auf den Vortrag von Herrn Dr. Fattal möchte ich erst morgen eingehen, weil ich meine, daß dieser Vortrag, obwohl seuchenhygienisch wichtig, doch eine Komponente hat, die wir morgen besser würdigen können als heute. Ich möchte jetzt Fragen stellen. Herrn Hahn möchte ich gerne fragen, wie er die Frage der Indikatorssysteme für humanpathogene Viren in Gewässern beurteilt. Ich bin eigentlich der gleichen Meinung wie Herr Prof. Mahnel, nämlich daß wir mit den in der heutigen Trinkwasserverordnung vorgesehenen Indikatoren durchaus in der Lage sind, ein einwandfreies Wasser zu garantieren. Ich bin aber nicht der Meinung, daß das für Oberflächenwasser zutrifft, sondern nur für Trinkwasser. Herrn Dr. Klein möchte ich die - allerdings mehr allgemeine - Frage stellen: Wie teuer wäre es, die Oberflächengewässer der Bundesrepublik seuchenhygienisch erheblich zu verbessern. Mit anderen Worten: Wieviel würde es kosten, die Qualität der Abwasserreinigung zu erhöhen?

Hahn: Ich beziehe mich auf die Indikatorssysteme, die heutzutage getestet werden oder eingeführt sind. Die Indikatormöglichkeiten, die Frau Obst angeprochen hat, also die Gensonden, die hoffentlich neue Möglichkeiten eröffnen, klammere ich zunächst aus. Die Frage nach einem Indikatorssystem möchte ich genauso beantworten wie Herr Lopez. Daß es beim derzeitigen Stand der Dinge nicht möglich ist, möchte ich mit drei Hauptaspekten beweisen. Der erste wichtige Aspekt ist einfach das Problem der Nachweismethodik: Es bestehen bei den wenigen Nachweisverfahren, die ich dargestellt habe, erhebliche Schwierigkeiten; bei zahlreichen nicht dargestellten Nachweisverfahren bestehen ähnliche oder andere Schwierigkeiten. Das zweite Problem ist, daß eine internationale Standardisierung bisher nicht vorhanden ist. Das dritte Problem ist, ob solche Standardisierung überhaupt möglich ist. Es ist tatsächlich so, daß zahlreiche Einflußfaktoren vorhanden sind, die eine weltweite Standardisierung, wie sie vielleicht in der Bakteriologie schon erreicht worden ist, in der Virologie nicht möglich machen.

Klein: Herr Lopez hatte noch eine Frage zur Wirtschaftlichkeit vorgelegt. Ich bin bei einem Besuch im Hause des Westdeutschen Rundfunks in Besitz einer Broschüre gekommen. In dieser wird dargestellt, daß die 16,50 DM, die der Bundesbürger für Rundfunk und Fernsehen bezahlt, doch vergleichsweise gering seien gegenüber dem Betrag, den man im Monat für eine Tageszeitung oder für eine Monatskarte für ein öffentliches Verkehrsmittel aufzubringen bereit ist. Die Abwasserreinigung, die inzwischen in der Regel schon teurer ist als die Trinkwasserversorgung, kostet um 10,-- DM pro Kopf und Monat. Die Versorgung mit dem lebensnotwendigen Trinkwasser kostet in den meisten Fällen ungefähr die Hälfte dessen, was die Versorgung mit Rundfunk und Fernsehen kostet. Nun kommen wir zu dem Punkt, den Herr Lopez ansprach: die Leistungsfähigkeit weitergehender Abwasserreinigungsverfahren. Wir haben uns ortsspezifisch in Berlin für die Sanierung des Tegeler Sees eine Phosphateliminierungsanlage geleistet, die rund eine Viertelmilliarde DM kostete. Alle Welt sagt natürlich, daß es Unsinn sei, eine Gewässeranierung bei diesem Preis überhaupt zu fordern. Die Gesamtkosten dieser Anlage (Kapital plus Betrieb) belaufen sich auf jährlich etwa 20 Millionen DM, pro Kopf der Berliner Bevölkerung im Jahr also rund 10,-- DM, das sind pro Kopf 0,83 DM im Monat für eine Anlage zur weitergehenden Abwasserreinigung, von der wir gehört haben, daß sie z.B. für die Eliminierung von Viren sehr viel leisten könnte, wenn wir sie als nachgeschaltete Stufe zu normalen konventionellen Klärwerken betreiben. Ich glaube, Viren aus dem Trinkwasser fernzuhalten ist mindestens gleichwertig mit der Versorgung mit Rundfunk- und Fernseherzeugnissen.

Hässelbarth: Wir haben uns hier - abgesehen von einzelnen Vorträgen über diese Probleme - letztmalig 1968 intensiv mit Viren befaßt. Wir müssen das aber immer wieder tun, um zu sehen, ob hier eine Gefahr besteht, die uns veranlaßt, Maßnahmen größeren Ausmaßes zu verlangen. In diesen 20 Jahren hat sich eine ganze Menge verändert und zwar auf dem Wasser/Abwasser-Gebiet in der Weise, daß wesentlich mehr Klärwerke gebaut worden sind und daß Abwässer in die Oberflächenwässer eingeleitet werden. Die Klärtechnik hat in der Zwischenzeit einen Tiefpunkt durchgemacht, weil man nach 1970 angenommen hat, man käme mit hochbelastbaren Anlagen, die nicht nitrifizieren, aus. In der Zwischenzeit ist man dahinter gekommen, daß die Qualität der Gewässer sich bei dieser Technik überhaupt nicht halten lassen kann. Diese beiden Momente wirken sich ganz erheblich auf die Trinkwasserversorgung aus. Um keine falsche Vorstellung bei der Trinkwasserversorgung aufkommen zu lassen: der größte Anteil kommt heute aus dem Grundwasser und es kann sein, daß erhöhte Beladung der Böden mit Flüssigmist und Gülle auch hier einen nachteiligen Einfluß hat. Bei Oberflächenwasser haben wir die Uferfiltration, und es gibt ganz wenige Fälle, wo wir Trinkwasser direkt entnehmen, nämlich bei Trinkwassertalsperren und bei zwei Seen. Bei der Oberflächenwasserentnahme über die Uferfiltration und bei Wasserentnahme aus dem Grundwasser legen wir aber Wert darauf, daß wir nicht zu desinfizieren brauchen, weil die Nebenwirkungen der

Desinfektion für den Menschen ausgesprochen nachteilig sind, insbesondere durch halogenorganische Verbindungen, die als gesundheitsschädlich angesehen werden müssen; halogenhaltige Desinfektionsmittel sind deshalb nicht gefragt. Die Halogenmengen, die für die Virusinaktivierung angegeben worden sind, waren unverhältnismäßig hoch; das haben auch unsere Versuche ergeben. Ein Beispiel: 30 mg Jod pro Liter kann man Menschen auf die Dauer nicht zumuten. Es ist natürlich bei drohender Gefahr erforderlich, die Abwasserklärung zu verbessern, denn offensichtlich ist die Belastung der Oberflächenwässer hauptsächlich auf den Einfluß von Abwasser zurückzuführen. Ein weiteres Problem sind die Schwimmbäder. Wir haben hier einmal die Oberflächenbäder; hier hat die EG schon 1978 eine regelmäßige Untersuchung auf Viren vorgeschrieben, die allenthalben bei uns nicht durchgeführt wird. Der Grenzwert liegt bei einer Einheit pro 10 Liter; es gibt noch einige Untersuchungen an der Seine, aber es gibt keine Epidemiologie. In den Beckenbädern sehen die Verhältnisse besser aus. Dort erreichen wir mit einer Aufbereitung und Desinfektion mit Chlor - in der Größenordnung von 0,3 bis 0,6 mg pro Liter - die Bäder tatsächlich so frei zu halten, daß wir keine Enteroviren finden. Das Problem ist hier nur, daß nicht alle Bäder diesem Standard entsprechen; über eine Epidemiologie von Badenden ist bisher nichts bekannt.

Lahmann: Ich leite im Institut für WaBoLu die Abteilung Lufthygiene und habe eine kurze Frage: Sind wir Luftleute aus der Pflicht, behalten also die Herren vom Wasser und Abwasser die Viren für sich, oder gibt es auch Probleme über den "Pfad Luft". Bei den Vorträgen sah ich - zumindest bei Herrn Prof. Shuval - ein Fragezeichen hinter "Aerosol als Quelle". Gibt es in Richtung Luft Handlungsbedarf, ist also ein Virenltransport auch durch die Luft möglich?

Shuval: (Übersetzung Lopez Pila): Prof. Shuval berichtet über seine Erfahrungen in Israel mit Sprinkelanlagen, die mit Abwasser betrieben werden. Man war durchaus in der Lage, in den Mikrodroplets Enteroviren nachzuweisen, und das Interessante ist, daß in diesen Proben Bakterien nicht nachweisbar waren. Er erwähnt, daß vielleicht Bakterien zwar dagewesen seien, aber - man denke an die Bemerkung von Prof. Timmis - diese vielleicht zu geschwächt oder fast inaktiviert waren. Er berichtet, daß kein Anhalt für epidemiologische Auswirkungen dieser Anlagen gefunden wurde. Ich möchte dazu bemerken, daß es sich um Studien in Kibbuzim gehandelt hat, also mit Populationen, die in engem Kontakt stehen und daß womöglich die erwachsene Bevölkerung, die exponiert wurde, bereits durchseucht war mit den Viren, die hier in Frage kamen. Sie fanden es zwar nicht statistisch signifikant, hatten aber doch den Eindruck, daß Kinder durch diese Sprinkelanlagen-Kontamination häufiger erkrankten.

Klein: Wir kommen natürlich bei dieser Frage auch sehr schnell wieder an den Punkt, da man sich die Abwägung vorzulegen hat: Müssen wir jetzt die Problematik der Aerosole oder die Luftverfrachtung von Viren daran bewerten, ob wir Erkrankungsfälle wirklich spürbar und nachweisbar dokumentieren kön-

nen, oder müssen wir eher dem Prinzip folgen, daß wir die Betriebsweise solcher belasteten Anlagen auf ein Niveau bringen, daß wir uns mit diesem Problem nicht in dem Maße auseinanderzusetzen haben. Ich denke, wenn wir etwas mehr Untersuchungen auf diesem Gebiet hätten, würde man wahrscheinlich auch sehr schnell die Verwendung solcher Anlagen einstellen.

Waldvogel (Kiel): Ich will noch einmal auf das Oberflächenwasser als Badewasser eingehen; ich glaube, man muß die EG-Richtlinie, die vorhin angesprochen worden ist, unter zwei Gesichtspunkten berücksichtigen: einmal unter dem Gesichtspunkt, daß ein möglichst optimales Wasser gefördert wird, d.h. daß möglichst keine Viren im Wasser sind. Es wäre aber andererseits sicherlich falsch oder sehr schwierig, das so auszulegen, daß nun keine Badewasser-Probe ein Virus enthalten darf. Ich glaube, das wäre unrealistisch und würde uns auch nicht weiterbringen. Keine Behörde sollte nun verpflichtet sein, grundsätzlich das Badewasser routinemäßig auf Viren zu untersuchen. In der hygienischen Beurteilung sollte man davon ausgehen, daß, wenn wir Coli finden, auch Viren im Wasser anwesend sind. Wir brauchen dringend epidemiologische Studien; ich glaube, das ist heute ein bißchen zu kurz gekommen. Ich weiß nicht, ob wir jemals einen entsprechenden Indikator überhaupt finden, bei der Vielzahl von Viren, bei den unterschiedlichen Verhaltensweisen, die die Viren zeigen, auch hinsichtlich der Erkrankungen des Menschen.

Klein: Vielen Dank für den Hinweis darauf, daß wir bedauerlicherweise in Europa mit dem Vollzug der EG-Badewasserhygiene noch sehr weit in den Kinderschuhen stecken. An vielen Stellen gerade in der Bundesrepublik sieht es im Fall, daß Badegewässer aus irgendwelchen Gründen problematisch erscheinen, so aus, daß eher ein Schild "Baden verboten" aufgestellt wird, als daß ein Klärwerk auf den Stand gebracht wird, daß man über die Virusproblematik nicht mehr nachdenken muß. Ich will Ihre Frage aber damit keineswegs beantwortet haben, sondern sie weitergeben an Prof. Lopez Pila.

Lopez Pila: Zwei Dinge haben Sie in der Frage noch einmal herausgestellt. Zum einen, daß die Epidemiologie bei Badegewässern sehr schwierig ist. Das Badewasserrisiko würde sich durchaus für epidemiologische Studien eignen, jedoch führen, wie wir heute morgen gehört haben, von den meisten Enterovirushinfektionen nur ein Bruchteil zu einer Erkrankung. Von 100 Exponierten und Infizierten erkranken vielleicht ein oder zwei Personen. Wenn es sich um ein Virus handelt mit einem größeren Verhältnis von Erkrankung zu Exposition, z.B. Hepatitis A, läßt sich die Epidemiologie viel besser betreiben. Zur Zeit wird aus China eine Epidemie von Hepatitis A gemeldet, die höchstwahrscheinlich durch Wasser übertragen wird. Zum anderen werfen Sie die Indikatorfrage auf, und ich kann mich mit dem, was Herr Hahn uns gesagt hat, doch nicht anfreunden, und ich habe den Eindruck, daß es Herrn Jung ebenso geht. Wenn man mit einem Wirtssystem arbeitet und keine Korrelation findet, so ist das noch kein Grund aufzugeben. Ich kann mir vorstellen, daß man mit 5 oder 10 Wirtsystemen zu einer akzeptablen Korrelation kommen würde. Ich möchte gerne

Herrn Jung bitten, etwas dazu zu sagen. Wie könnte man vorgehen, um mit Bakteriophagen, die ja doch so billig und so unaufwendig zu bestimmen sind, zu einer Indikatorfunktion zu kommen?

Jung: Um fast alle Coliphagen zu erfassen, brauchte man mindestens ein System von vier Wirten. Die Schwierigkeit dabei ist, daß je nach Wasserbeschaffenheit und Temperatur die Beurteilung unterschiedlich auszufallen hat, da die Phagenvermehrung bei der Bewertung unbedingt berücksichtigt werden muß.

Hahn: Zu Herrn Jung: In meinem Vortrag hatte ich nur ein Beispiel gewählt, um auf Indikatoren hinzuweisen. Mein Schwerpunkt waren die Aufkonzentrierungsverfahren. Zu Herrn Lopez möchte ich sagen, daß es sicherlich ein Mißverständnis war, wenn Sie gehört haben wollen, daß es keinen Sinn habe, in Oberflächengewässern nach Coliphagen als Indikatoren zu suchen. Ich wollte nur darauf hinweisen, daß - auch bei starker Belastung - standardisierte Methoden fehlen. Das war eigentlich meine zentrale Aussage.

Wyler: Ich möchte Herrn Prof. Lahmann sagen, daß es ein Beispiel dafür gibt, daß die Maul- und Klauenseuche über Hunderte von Kilometern durch die Luft übertragen werden kann. Der letzte Fall war eine Maul- und Klauenseuche in der DDR.

Tab. 1: Aus Oberflächengewässern isolierte Pflanzenviren

Virusgruppe und Virus	Referenzen
Carmovirus-Gruppe carnation mottle virus	Koenig und Lesemann (1985)
Tombusvirus-Gruppe carnation Italian ringspot virus tomato bushy stunt virus	Büttner et al. (1987) Tomlinson and Faithfull (1984)
Neckar river tombusvirus Petunia asteroid mosaic virus	Koenig und Lesemann (1985) Koenig and Lesemann (1985) Rüdel, Koenig und Lesemann unveröffentlicht
Tobacco necrosis virus-Gruppe tobacco necrosis virus	Tomlinson et al. (1983)
Dianthovirus-Gruppe carnation ringspot virus	Koenig et al. (1988)
Cucumovirus-Gruppe cucumber mosaic virus	Piazolla et al. (1985)
Tobamovirus-Gruppe cucumber green mottle mosaic virus tobacco mosaic virus	Rydén (1965), van Dorst (1969) Tosić and Tosić (1984)
tomato mosaic virus pepper mild mottle virus bell pepper mottle virus	Koenig and Lesemann (1985) van Dorst (1969) Lesemann und Koenig, unveröffentl.
Aller river tobamovirus Sieg river tobamovirus	Lesemann und Koenig, unveröffentl. Koenig und Lesemann, unveröffentl. Koenig und Lesemann, unveröffentl.
Potexvirus-Gruppe Sieg river potexvirus	Koenig and Lesemann (1985)
Eurovirus-Gruppe beet necrotic yellow vein virus	Heijbroek (1987)

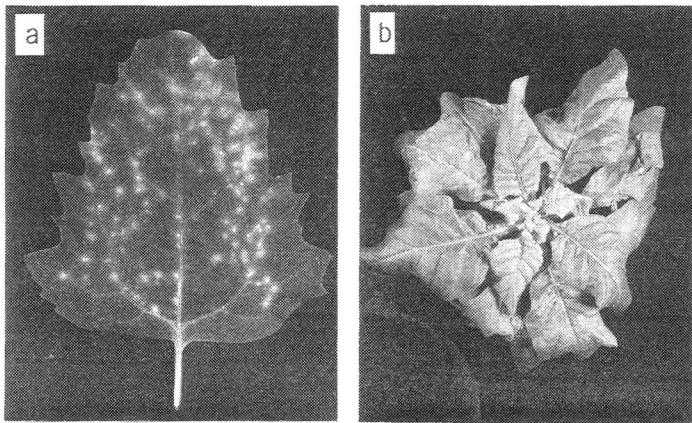


Abb. 1: Typische Reaktionen von Testpflanzen nach Infektion durch in Gewässern vorkommende Viren. a) Blatt von *Chenopodium quinoa* mit chlorotischen, im Zentrum nekrotischen Lokalläsionen bei Infektion mit bell pepper mottle virus. b) Blattrosetten von *Nicotiana clevelandii* nach systemischer Infektion mit tobacco mosaic virus. Zu erkennen ist die Sproßstauchung sowie die Vergilbung, Verkleinerung und Deformierung der jüngsten Blätter

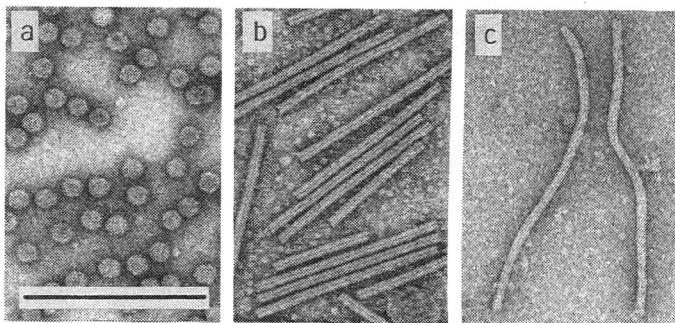


Abb. 2: Typische Morphologie von aus Gewässern isolierten Pflanzenviren. a) Neckar river tombusvirus, b) tobacco mosaic virus, c) Sieg river potexvirus. Negativ kontrastierte elektronenmikroskopische Präparate bei gleicher Vergrößerung. Der Maßstab entspricht 300 nm

Pflanzenpathogene Viren in Oberflächengewässern

D.-E. Lesemann und R. König

ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzenpathogene Viren finden sich weitverbreitet als Kontaminanten in Oberflächengewässern. Viele von ihnen sind lange bekannte Schaderreger bei Kulturpflanzen. Es wurden aber auch 'neue' Viren gefunden, deren natürliche Wirkung man noch nicht kennt. Sie müssen als potentielle Schaderreger für Kulturpflanzen betrachtet werden. Die vorliegende Übersicht gibt eine Zusammenstellung der bisher isolierten Viren. Einige gemeinsame Eigenschaften dieser Viren werden beschrieben. Isolierungsverfahren werden kurz vorgestellt und epidemiologische Fragen, z.B. Herkünfte und Verbreitungsmechanismen der Viren in Oberflächengewässern werden diskutiert.

Die Kontamination verschiedener Oberflächengewässer durch human- und tierpathogene Viren hat schon seit längerer Zeit intensives Interesse gefunden. Dagegen ist das verbreitete Vorkommen von pflanzenpathogenen Viren in Oberflächengewässern erst seit Anfang der achtziger Jahre näher untersucht worden. Zunächst wurden in England das tobacco necrosis virus und das tomato bushy stunt virus aus Fluß- und Teichwasser sowie aus Pflanzen, die auf Klärschlamm städtischer Abwässer spontan keimten, isoliert [Tomlinson and Faithful 1984]. Später konnte von mehreren Arbeitsgruppen eine ganze Reihe von pflanzenpathogenen Viren aus verschiedenen Gewässern in Europa (Jugoslawien, Italien, Bundesrepublik Deutschland) und in Stichproben auch in anderen Kontinenten nachgewiesen werden. Eine ausführliche Literaturübersicht wurde von Koenig (1986 und 1988) gegeben. In der Bundesrepublik Deutschland wurden derartige Untersuchungen vor allem vom Institut für Viruskrankheiten der Pflanzen der Biologischen Bundesanstalt Braunschweig sowie vom Institut für Pflanzenkrank-

heiten der Universität Bonn (Prof. Dr. Nienhaus) durchgeführt [Koenig und Lemann 1986; Büttner 1987; Büttner et al. 1987; Koenig et al. 1988]. nach den jetzt vorliegenden Erfahrungen kann festgestellt werden, daß, mit wenigen Ausnahmen, in jedem Gewässer schon bei stichprobenartiger Untersuchung pflanzenpathogene Viren nachzuweisen sind.

Die zur Isolierung von pflanzenpathogenen Viren verwendeten Methoden umfassen in der Regel zunächst einen Konzentrierungsschritt, wobei Adsorptions-, Filter- und Zentrifugationsverfahren angewandt wurden [Überblick bei Koenig 1986]. Nach unserer Erfahrung ist die Ultrazentrifugation von ca. 300 ml Probenwasser ein effektiver Weg, vorhandene Pflanzenviren in für eine Infektion ausreichender Menge zu konzentrieren. Die erhaltenen Sedimente werden, mit wenig Puffer vermischt, durch Abreiben auf Blätter geeigneter Testpflanzen inkokultiert. Die Pflanzenarten, z.B. *Chenopodium quinoa* oder *Nicotiana clelandii* und verwandte Arten, werden aufgrund ihrer bekannten Anfälligkeit für ein breites Spektrum pflanzenpathogener Viren ausgewählt. Die Reaktion der Testpflanzen wird im Falle einer Infektion in der Regel als Lokalläsion und/oder systemische Infektion erkennbar (Abb. 1). Häufig werden zunächst nur einzelne oder sehr wenige Läsionen erhalten, aus denen jedoch sehr einfach Inkolum für die weitere Vermehrung und Erhaltung des isolierten Virus gewonnen werden kann. Die Identifizierung bzw. Charakterisierung der erhaltenen Isolate erfolgt mit pflanzenvirologischen Standardmethoden. In der Regel steht am Anfang die elektronenmikroskopische Untersuchung, die Information über die Partikelmorphologie und damit gegebenenfalls über die Zugehörigkeit zu einer der definierten Virusgruppen liefert (Abb. 2). Eine Vielzahl von serologischen Verfahren erlaubt dann, ein Isolat entweder als schon bekanntes Virus zu identifizieren oder als "neues" Virus zu charakterisieren. Alternativ oder ergänzend können heute besonders effektiv c-DNA-Hybridisierungstechniken in Anwendung kommen [Koenig et al. 1988].

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bisher in Gewässern nachgewiesenen Pflanzenviren und ihre taxonomische Stellung. Verschiedene taxonomische Gruppen von Pflanzenviren mit einsträngigen RNAs sind vertreten. Jedoch weisen die meisten der angeführten Viren bestimmte gemeinsame Eigenschaften auf. 1) Sie werden in hohen Konzentrationen in infizierten Pflanzen produziert; 2) sie werden in beträchtlichen Mengen auch aus unverletzten Wurzeln ihrer Wirte freigesetzt; 3) sie haben in der Regel keinen Vektor für eine Verbreitung durch die Luft; 4) sie weisen in der Regel hohe Stabilität gegenüber inaktivierenden Faktoren auf; 5) sie können Wurzeln geeigneter Pflanzen ohne Hilfe eines Vektors infizieren; 6) sie besitzen einen weiten Wirtskreis und 7) können sie von einer einmal infizierten Wirtspflanze ausgehend, leicht durch mechanische Übertragung Nachbarbestände infizieren. Eine Ausnahme stellt in der Tabelle das *cucumber mosaic virus* dar, das durch Blattläuse übertragen werden kann und als nicht besonders stabiles Virus gilt. Eine mögliche Erklärung für sein Vorkommen in Flusswasser in Italien wird darin gesehen, daß instabile Viren

wie cucumber mosaic virus durch Adsorption an Tonmineralien oder organische Schwebstoffpartikel eine Stabilisierung erfahren [Piazolla et al. 1986]. Ein solcher Stabilisierungsmechanismus könnte vermutlich auch andere weniger stabile Viren beim Transport in Gewässern infektiös erhalten [Koenig 1986]. Eine andere Art der Stabilisierung kann durch Assoziation eines Virus mit den Dauersporen eines Pilzes erreicht werden, z.B. wird das wirtschaftlich besonders gefährliche Rizomaniavirus der Zuckerrübe (beet necrotic yellow vein virus) in den Dauersporen des Pilzes *Polymyxia betae* transportiert.

Über die Quellen der Gewässerkontamination ist, mit Ausnahme einiger spezieller Fälle, bisher nur wenig bekannt. Offenbar werden aber große Virusmen gen in der Vegetation der jeweiligen Einzugsgebiete produziert. Dies gilt nicht nur für intensiv betriebene landwirtschaftliche und gärtnerliche Kulturen, sondern auch für mehr oder weniger natürliche Ökosysteme. Die folgenden Punkte sollen kurz andeuten, in welcher Richtung die praktische Bedeutung der Gewässerkontamination durch Pflanzenviren liegen könnte.

1. Anscheinend spontane Virusinfektionen, die besonders in Intensivkulturen zu Epidemien führen können, lassen sich zumindest z.T. aus der Viruskontamination des Gießwassers erklären. Zur Bewässerung wird, wo verfügbar, Wasser aus Flüssen, aber auch aus Entwässerungsgräben verwendet. Für Gemüsekulturen, z.B. Gurken- und Tomatenintensivkulturen, ist verschiedentlich eine Kontamination mit cucumber green mottle mosaic oder tomato mosaic virus durch Sickerwasser oder rezirkulierte Nährlösung nachgewiesen worden. Komposthaufen aus infizierten Pflanzen in Gärtnereien, aber auch Abfalldeponien von Großmärkten können länger als 9 Monate Virus abgeben [van Dorst 1969; Ryden 1965; Kegler et al. 1983].
2. Im Zuge der heute üblichen weltweiten Frischpflanzentransporte werden z.B. mit Gemüse, Früchten und Zierpflanzen Viren entfernter Regionen bei uns eingeführt. Solche Viren können über Abfalldeponien aber auch über Haushaltsabwasser in Flüsse und andere Gewässer gelangen. Verschiedene pflanzenpathogene Viren passieren den Darmtrakt von Mensch und Tier in infektiöser Form, und auch so können 'fremde' Viren über Gewässer in einheimische Kulturpflanzen gelangen [Tomlinson et al. 1982; Kegler et al. 1984].
3. Bei den meisten der aus Gewässer isolierten Viren handelt es sich um lange bekannte Krankheitserreger von Kulturpflanzen. Einige sind nur sporadisch aus Kulturpflanzen isoliert worden, z.B. das carnation Italian ringspot virus, bei dem Rückübertragungen auf Nelken zudem nur mit Schwierigkeiten gelingen [Hollings et al. 1970]. Kürzlich wurde dieses Virus in einem Waldbach in Nordrhein-Westfalen nachgewiesen [Büttner et al. 1987], und inzwischen trat es auch in einem erkrankten Kirschbaum in Baden-Württemberg auf [L. Kunze, D.-E. Lesemann und R. Koenig, unveröffentlicht]. Damit ist wahrscheinlich, daß dieses Virus nicht als ursprüngliches Nelkenvirus anzusehen ist. Es kommt offensichtlich auch in anderen Ökosystemen und auch in holzigen Pflanzen vor. Man kann generell annehmen, daß die Analyse

- der in Gewässern vorkommenden Viren Aufschlüsse über die Verbreitung und über die Reservoirs der unsere Kulturpflanzen bedrohenden Viren ergeben wird. Einige von uns ebenfalls isolierte, bisher noch nicht bekannte Viren sollten als potentielle Schaderreger für Kulturpflanzen betrachtet werden.
4. Einige der aus Gewässern isolierten Viren kommen in Waldbäumen vor und es wurde vermutet, daß sie eine prädisponierende Rolle bei der Entstehung der sehr komplexen neuartigen Waldschäden spielen könnten [Nienhaus 1985; Büttner 1987].

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Pflanzenviren aus verschiedenen taxonomischen Gruppen weit verbreitet in Oberflächengewässern vorkommen. Im Institut für Viruskrankheiten der Pflanzen der Biologischen Bundesanstalt führen wir z.Z. Untersuchungen über Ausmaß, Herkünfte und mögliche epidemiologische Konsequenzen dieser Viruskontaminationen durch und prüfen, ob Zusammenhänge mit einigen ätiologisch nicht geklärten Krankheitsscheinungen (z.B. neuartigen Waldschäden) bestehen.

DANKSAGUNG

Dem Bundesminister für Forschung und Technologie danken wir für die finanzielle Unterstützung einiger Teilaufgaben unserer Untersuchungen (Förderungskennzeichen 39107 A und 39165 A).

LITERATUR

- Büttner, C.: Untersuchungen zur Viruskontamination von Böden und Gewässern in Waldökosystemen. Dissertation Universität Bonn (1987), 165 pp.
- Büttner, C., Jacobi, V., and Koenig, R.: Isolation of carnation Italian ring-spot virus from a creek in a forested area south west of Bonn. Journal of Phytopathology 118 (1987), 131 - 134
- Heijbroek, W.: Dissemination of rhizomania by water, soil and manure. Proc. 50th Wintercongress IIRB, Brussels, (1987), 35 - 43
- Hollings, M., Stone, O.M., and Boutell, G.C.: Carnation Italian ringspot virus. Annals of Applied Biology 65 (1970), 299 - 309
- Kegler, H., Kleinheppel, H., and Stanarius, A.: Evidence of infectious plant viruses after passage through the rodents alimentary tract. Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz 20 (1984), 189 - 193

Kegler, H., Griesbach, E., Skadow, K., Fritsche, E., und Weber, I.: Ausbreitung von Krankheitserregern und Schädlingen der Tomate in NFT-Kultur und ihre Vorbeugung. Nachrichtenbl. für den Pfl. Schutz in der DDR 37 (1983), 28 - 29

Koenig, R.: Plant viruses in rivers and lakes. Advances in Virus Research 31 (1986), 321 - 333

Koenig, R.: Detection in surface waters of plant viruses with known and unknown natural hosts. In: 'Developments in Applied Biology 2: Fungus-transmitted Viruses', I.J. Cooper, ed., Association of Applied Biologists, Wellesbourne, U.K. (1988) in press

Koenig, R., and Lesemann, D.-E.: Plant viruses in German rivers and lakes. I. Tombusviruses, a potexvirus and carnation mottle virus. Phytopathologische Zeitschrift 112 (1985), 1105 - 116

Koenig, R., An, D., Lesemann, D.-E., and Burgermeister, W.: Isolation of carnation ringspot virus from a canal near a sewage plant: cDNA hybridization analysis, serology and cytopathology. Journal of Phytopathology 121 (1988), 26 - 31

Nienhaus, F.: Infectious diseases in forest trees caused by viruses, mycoplasma-like organisms and primitive bacteria. Experientia 41 (1985), 597 - 603

Piazolla, P., Castellano, M.A., and de Stradis, A.: Presence of plant viruses in some rivers in southern Italy. Journal of Phytopathology 116 (1986), 244 - 246

Ryden, K.: Kan grönmosaikvirus spridas med vatten? Växtskydds-Notiser 5 (1965), 68 - 69

Tomlinson, J.A., and Faithfull, E.M.: Studies on the occurrence of tomato bushy stunt virus in English rivers. Annals of Applied Biology 104 (1984), 485 - 495

Tomlinson, J.A., Faithfull, E.M., Flewett, T.H., and Beards, G.: Isolation of infective tomato bushy stunt virus after passage through the human alimentary tract. Nature, London 300 (1982), 637 - 638

Tomlinson, J.A., Faithfull, E.M., Webb, M.J.W., Fraser, R.S.S., and Seeley, N.D.: Chenopodium necrosis: a distinctive strain of tobacco necrosis virus isolated from river water. *Annals of Applied Biology* 102 (1983), 135 - 147

Tosic, M., and Tosic, D.: Occurrence of tobacco mosaic virus in water of the Danube and Sava rivers. *Phytopathologische Zeitschrift* 110 (1984), 200 - 202

Van Dorst, H.J.M.: Virus diseases of cucumbers. Annual Report of the Glasshouse Crops Research and Experimental Station, Naaldwijk, Netherlands, (1969), p. 75

Einsatz von insektenpathogenen Viren im Pflanzenschutz

J. Huber

ZUSAMMENFASSUNG

Viren mit Insekten als Wirtsorganismen finden sich in einer Reihe verschiedener Virusfamilien. Außer bei den Baculoviridae treten aber in den selben Familien immer auch Viren auf, die Wirbeltiere oder sogar Säugetiere und den Menschen befallen. Baculoviren, die etwa 60% aller bekannten Insektenviren ausmachen, sind bis jetzt nur bei Arthropoden gefunden worden. Am häufigsten verbreitet sind sie in der Insektenordnung der Lepidopteren, wo sie bei etwas mehr als 600 Arten, darunter vielen land- und forstwirtschaftlichen Schädlingen, beschrieben worden sind. Die Tatsache, daß Baculoviren in verschiedenen Insektenordnungen gefunden werden, bedeutet nicht, daß ein einzelner Vertreter von ihnen ein so breites Wirtsspektrum besitzt. Vielmehr handelt es sich um äußerst spezifische Viren, die im allgemeinen nur einige wenige, nah verwandte Wirtsarten befallen. Diese hohe Selektivität macht Baculoviren zu idealen Komponenten von integrierten Pflanzenschutz-Programmen.

Zwei der grundlegenden Prinzipien im integrierten Pflanzenschutz sind (1) die Beachtung von Schadensschwellen und (2) die gezielte Bekämpfung nur derjenigen Schaderreger, die diese Grenzen überschreiten. Ersteres hat vor allem zum Ziel, eine unnötige Belastung der Umwelt durch Pflanzenschutzmittel zu verhindern. Durch letzteres, d.h. durch die Verwendung möglichst selektiv wirkender Bekämpfungsmaßnahmen gegen einige wenige Schlüsselschädlinge, soll erreicht werden, daß das Ökosystem in der zu schützenden Kultur möglichst wenig gestört wird. Insbesondere sollen die vorhandenen natürlichen Gegenspieler der Schädlinge weitestgehend geschont werden. Die dabei an ein selektiv wirkendes Insektizid gestellten Anforderungen erfüllen die Baculoviren in geradezu idealer Weise. Sie wirken nur auf das Zielinsekt und lassen selbst andere indifferente Lepidopteren-Larven, die möglicherweise Räuber und Parasiten als Nahrungsgrundlage dienen, unbehelligt.

Bis heute haben weltweit etwa ein Dutzend Präparate auf der Basis von Baculoviren eine amtliche Zulassung als Pflanzenschutzmittel erhalten. Während in den Vereinigten Staaten schon vier und in Kanada drei Präparate zugelassen sind, gibt es in Europa erst zwei zugelassene Viruspräparate: In England darf das Mittel "Virox" gegen Blattwespen im Forst und in der Schweiz "Madex" gegen Apfelwickler im Obstbau eingesetzt werden.

Trotz des indirekten Nachweises ihrer Unbedenklichkeit für Wirbeltiere aufgrund ihrer Beschränkung auf Arthropoden-Wirte, hatten die Viren für ihre Zulassung eine Vielzahl von Tests zu bestehen, die auch Langzeituntersuchungen auf Karzinogenität und Teratogenität bei Säugetieren, sogar bei Primaten, umfaßten. Sämtliche geprüften Baculoviren erwiesen sich, im Gegensatz zu den Wirkstoffen fast aller chemischen Insektizide, als ungefährlich für Mikroorganismen, Pflanzen, Wirbellose außer Arthropoden und Wirbeltiere.

EINLEITUNG

Bei Diskussionen um die Notwendigkeit des Pflanzenschutzes in der Landwirtschaft taucht des öfteren das Schlagwort von der "Selbstregulierung des Agroökosystems" auf. Dabei wird die Meinung vertreten, daß, guten Gesundheitszustand der Pflanzen vorausgesetzt, in einem sich selbst überlassenen landwirtschaftlichen Ökosystem die natürlicherweise vorhandenen Gegenspieler der Krankheiten und Schädlinge, die sogenannten Nützlinge, in der Lage sind, erstere in tragbaren Grenzen zu halten. Aber gerade bei diesen Grenzen liegt das Problem. In einem sich selbst überlassenen System wird sich zwar nach einiger Zeit ein ökologisches Gleichgewicht einstellen. Leider liegt dabei die Schädlingsdichte aber nicht immer so niedrig, daß der verursachte Schaden an den Pflanzen oder am Erntegut ökonomisch noch tolerierbar ist. Wenn die Gleichgewichtslage oberhalb der Schadensschwelle liegt, muß der Landwirt regulierend mit Pflanzenschutzmaßnahmen eingreifen. Für den Selbstverbraucher und bestimmte Märkte ("biologische" landwirtschaftliche Produkte) besteht zwar noch die Möglichkeit, die Schadensschwelle höher anzusetzen, das heißt einen höheren Schaden am Erntegut in Kauf zu nehmen. Im allgemeinen ist die ökonomische Schadensschwelle für den gewerbsmäßigen Landwirt aber durch die Qualitätsnormen des Handels auf der einen und die Preise der Pflanzenschutzmittel auf der anderen Seite vorgegeben.

Das Problem wird zudem dadurch vergrößert, daß man es im allgemeinen nicht mit einem einzigen Schädling zu tun hat, sondern mit einer Vielzahl von schädlichen, nützlichen und "indifferenten" Arten, die alle miteinander in Wechselwirkung stehen. Einige dieser Schädlinge liegen in ihrer Dichte in einem sich selbst überlassenen System über der Schadensschwelle, andere darunter. So treten zum Beispiel in einem naturbelassenen Obstgarten die Spinnmilben normalerweise nicht in schädigenden Ausmaßen auf, der Apfelwickler dagegen führt

zu nicht tolerierbaren Schäden am Ernteobst und muß deshalb bekämpft werden. Geschieht dies mit einem herkömmlichen Insektizid, so wird aufgrund des breiten Wirkungsbereiches des Mittels nicht nur das Zielinsekt Apfelwickler abgetötet, sondern eine Vielzahl anderer, häufig nützlicher Arten, unter ihnen auch Gegenspieler der Spinnmilbe. Durch den Wegfall ihrer natürlichen Feinde können sich letztere nun hemmungslos vermehren und überschreiten innerhalb kürzester Zeit die Schadensschwelle [14]. Das Apfelwicklerproblem ist dann zwar gelöst, dafür müssen jetzt die Spinnmilben bekämpft werden. Ganz anders würde es aussehen, wenn man den Apfelwickler gezielt mit einem selektiv wirkenden Präparat bekämpfen könnte. Dann würde das restliche Apfelbaum-Ökosystem nicht gestört und negative Effekte und Folgeschäden durch Sekundärschädlinge würden unterbleiben.

Für die chemische Industrie ist die Bereitstellung von Pflanzenschutzmitteln mit einem so engen Wirkungsspektrum wenig attraktiv. Die Entwicklungskosten für ein solches Präparat sind annähernd so hoch wie für ein breitwirkendes Produkt, die selektive Wirkung - es kann nur gegen einen einzigen Schädling eingesetzt werden - schränkt aber die Verkaufsmöglichkeiten stark ein und lässt nur einen geringen Erlös erwarten.

In der Form der Insektenviren stellt uns zum Glück die Natur selbst die ökologisch so wünschenswerten selektiven Pflanzenschutzmittel zur Verfügung [4]. Aufgrund ihrer extrem hohen Wirtsspezifität - in vielen Fällen ist für ein bestimmtes Virus nur ein einziger Wirt bekannt - eignen sie sich in hervorragender Weise für eine gezielte Bekämpfung von schädlichen Insekten in der Land- und Forstwirtschaft.

TAXONOMIE, MORPHOLOGIE UND PATHOLOGIE DER INSEKTENVIREN

Viren mit Insekten als Wirtsorganismen kommen in einer Reihe verschiedener Virusfamilien vor (Tab. 1). Außer bei den Baculoviridae finden sich aber in all diesen Familien auch immer Viren, die Säugetiere und andere Wirbeltiere befallen, oder die sogar als Erreger von Krankheiten des Menschen bekannt sind. Baculoviren dagegen, zu denen etwa 60% aller bekannten Insektenviren gehören, sind bis heute nur bei Arthropoden gefunden worden, nicht bei anderen wirbellosen Tieren und erst recht nicht bei Wirbeltieren. Schon aus diesem Grund haben in erster Linie Vertreter dieser Virusfamilie im biologischen Pflanzenschutz Eingang gefunden. Am häufigsten vertreten sind Baculoviren in der Insektenordnung der Lepidopteren, wo sie bei etwas mehr als 600 Arten, darunter vielen land- und forstwirtschaftlichen Schädlingen, beschrieben worden sind [12]. Außerhalb des Tierstammes der Insekten wurden Baculoviren erst zweimal bei Milben und siebenmal bei Krebsen gefunden.

Baculoviren sind DNS-Viren mit stäbchenförmigen Nucleocapsiden. Als eine Besonderheit, die sie mit einigen anderen Insektenviren wie den Entomopoxvi-

ren und den Zytomplasmopolyederviren teilen, sind die Virionen der Baculoviren im allgemeinen in dicke Proteinhüllen, die sogenannten Einschließungskörper, eingebettet. Diese Hülle schützt die Viren vor Umwelteinflüssen und ermöglicht ihnen ein Überleben über längere Zeit auch außerhalb der Wirtszellen [11]. Aufgrund dieses Schutzmechanismus können es sich die Viren "leisten", hochvirulent zu sein und die empfindlichen Stadien ihres Wirtes, die manchmal nur wenige Wochen im Jahr in der Natur vorhanden sind, abzutöten, ohne ihren eigenen Fortbestand zu gefährden. Durch die Einschließungskörper geschützt überdauern sie bis zum Auftreten einer neuen Generation ihres Wirtes im folgenden Jahr. Diese relativ gute Persistenz ist natürlich auch für die Verwendung der Viren als biologisches Insektizid von Vorteil. Die Einschließungskörper erleichtern zudem das Arbeiten mit diesen Viren erheblich. Sie sind so groß, daß die Viren im Lichtmikroskop sichtbar sind und ohne Hilfe des Elektronenmikroskopes diagnostiziert und ausgezählt werden können. Anhand der Morphologie der Einschließungskörper erfolgt die Einteilung der Baculoviren in drei taxonomische Gruppen [13]:

- A. Kernpolyederviren (NPV): Viele Nucelocapside, einzeln oder zu Bündeln vereint, gemeinsam in große, häufig polyederförmige Einschließungskörper eingebettet,
- B. Granuloseviren (GV): Jedes Virion für sich allein in reiskornförmige Einschließungskörper eingebettet,
- C. Baculoviren ohne Einschließungskörper (NOBV): Es werden überhaupt keine Einschließungskörper gebildet.

Baculoviren befallen bevorzugt die Larvenstadien ihrer Insektenwirte. Die Viren werden mit der Nahrung aufgenommen und gelangen in den Mitteldarm. Dort werden die Einschließungskörper aufgelöst und die Virionen freigesetzt. Über die Mikrovilli dringen sie in die Epithelzellen des Mitteldarms ein, in deren Zellkernen sie normalerweise einen ersten Vermehrungszyklus durchlaufen [6]. Anschließend werden sie ins Haemocoel ausgeschleust, wo sie durch den Blutkreislauf im ganzen Körper verteilt werden und von wo aus sie eine ganze Reihe von Geweben, wie Fettkörper, Hypodermis, Tracheenmatrix usw. befallen. Es werden schließlich wieder Einschließungskörper gebildet, die von den in Lysis übergehenden Zellen freigesetzt werden. Bei der Virogenese werden keine Toxine gebildet. Der Wirt wird erst zu einem relativ späten Zeitpunkt dadurch abgetötet, daß die ungeheure Vermehrung der Viren und die anschließende Lyse der Zellen lebenswichtige Organe funktionsunfähig macht.

Interessant ist, daß, obwohl Baculoviren unter in vitro Bedingungen recht unspezifisch von einer Vielzahl von Zellen aufgenommen werden, ihre Vermehrung nur in Zellen einiger weniger Wirtsarten ablaufen kann [2]. Von vielen ist überhaupt nur ein einziger Wirt bekannt, andere befallen zwar eine Reihe nah verwandter Wirtsarten, meist aber innerhalb derselben Insektenfamilie (Tab. 2). Eine Übertragung eines Baculovirus auf eine zu einer anderen Insektenord-

nung gehörende Art (z.B. eines Virus aus einer Schmetterlingsraupe auf eine Käferlarve) ist bis jetzt noch nie beobachtet worden. Wie oben ausgeführt, ist diese hohe Selektivität der Hauptgrund für die Verwendung der Baculoviren im Pflanzenschutz.

BACULOVIREN ALS BIOLOGISCHE PFLANZENSCHUTZMITTEL

Es ist geschätzt worden, daß weltweit bei etwa 30% aller landwirtschaftlichen Schädlinge eine Bekämpfung mit Baculoviren möglich wäre [5]. In der Bundesrepublik wurden Baculoviren schon gegen etwa 15 land- und forstwirtschaftliche Schädlinge in Freilandversuchen mit gutem Erfolg getestet [9]. Bis heute wurden Baculoviren großflächig aber vor allem in den Wäldern Nordamerikas und im landwirtschaftlichen Bereich in einigen Entwicklungsländern eingesetzt [8]. Insgesamt sind in den Vereinigten Staaten von Amerika und in Kanada 7 Präparate auf der Basis von Baculoviren als Pflanzenschutzmittel zugelassen. In Europa besitzen zwei Präparate eine amtliche Zulassung: In Großbritannien darf ein Kernpolydervirus gegen Blattwespen im Forst und in der Schweiz ein Granulosevirus gegen den Apfelwickler im Obstbau eingesetzt werden.

Ein Haupthindernis für eine größere Verbreiterung der Baculoviren im Pflanzenschutz stellt gerade ihre - aus ökologischer Sicht so positive - hohe Selektivität dar. Sie führt zu einem ökonomischen Mißverhältnis von Entwicklungs- und Zulassungskosten einerseits und - aufgrund des kleinen Absatzmarktes - geringem Verkaufserlös andererseits [9]. Auch besitzen Viruspräparate weniger Reserven gegenüber Fehlern bei der Ausbringung und bei der Wahl des Bekämpfungszeitpunktes und erfordern deshalb mehr Sorgfalt von der Seite des Anwenders. Im Gegensatz zu den meisten chemischen Insektiziden weisen Insektenviren keine Kontaktwirkung auf, sondern müssen gefressen werden um wirken zu können. Ei- und Puppen-, häufig aber auch Imaginalstadium des Schädlings können sie deshalb nicht beeinflussen. Wirkungsgrade von 99,9% und mehr, wie sie für viele synthetische Präparate üblich sind, erreichen sie nicht. Dies ist auch gar nicht notwendig: Viruspräparate rotten den Schädling nicht aus; es stellt sich vielmehr ein neues Gleichgewicht zwischen Schädling und Nützlingen ein, das jetzt aber unter der Schadensschwelle liegt.

Trotz des indirekten Nachweises ihrer Unbedenklichkeit für Wirbeltiere aufgrund der Beschränkung ihres Auftretens auf Arthropoden-Wirte hatten die Baculoviren vor ihrer Freisetzung im Rahmen von Pflanzenschutzprogrammen eine Vielzahl von Tests an Vertretern der unterschiedlichsten Tiergruppen zu bestehen [1]. Neben Versuchen zur Toxizität, Pathogenität und Allergenität an Nichtzielorganismen in vivo wurden in vitro-Versuche mit verschiedenen Zellkulturen durchgeführt. Die Tests umfaßten zudem Langzeit-Untersuchungen auf Karzinogenität und Teratogenität bei Säugetieren, sogar auch bei Primaten. Sämt-

liche Versuche ergaben keine Erkenntnisse irgendwelcher Art, aus denen sich eine mögliche Gefährdung des Menschen oder anderer Nicht-Zielorganismen durch Baculoviren ableiten ließe [3, 7]. Auch darin unterscheiden sich Präparate auf der Basis von Baculoviren wesentlich von herkömmlichen Pflanzenschutzmitteln. Die Wirkstoffe chemischer Insektizide sind in den meisten Fällen nicht nur für Insekten sondern für viele andere Organismen, z.T. sogar für den Menschen, toxisch [10]. Unter allen in der Bundesrepublik gegen Insekten zugelassenen chemischen Pflanzenschutzmitteln finden sich nur zwei, die in keiner Giftklasse und weder fischgiftig noch bienengefährlich sind: Ein Insektenpheromon und ein Kaliseife-Präparat. Die meisten Wirkstoffe können deshalb nur dann im Pflanzenschutz eingesetzt werden, wenn bei ihrer Ausbringung eine Reihe von Auflagen zum Schutz des Menschen und seiner Umwelt eingehalten werden (z.B. Beachtung von Wartezeiten, Anwendungsverbot in der Nähe von Gewässern, Vermeidung von Abdrift etc.).

Die große Bedeutung, die Baculoviren in neuster Zeit als wirkungsvolle Expressionsvektoren in der Gentechnologie erlangt haben und die dadurch stimulierten molekularbiologischen Forschungen an Baculoviren, haben auch die Möglichkeit in greifbare Nähe gerückt, mit Hilfe der Gentechnologie bestimmte Eigenschaften dieser Viren im Hinblick auf ihre Verwendung im Pflanzenschutz gezielt zu verändern. Im einzelnen ist dabei vor allem an folgende "Verbesserungen" gedacht:

- a) Veränderung des Wirtschaftsbereiches: Dadurch können Schaderreger, für die kein natürliches Virus bekannt ist, einer Bekämpfung zugänglich gemacht werden. Ein vergrößerter Wirtschaftsbereich bedeutet auch bessere Absatzmöglichkeiten für ein entsprechendes industrielles Präparat.
- b) Erhöhung der Virulenz: Ziel ist eine verbesserte Wirkung im praktischen Einsatz und ggf. Effektivität auch gegen andere (ältere) Stadien des Schädlings.
- c) Schnellere Abtötung der Schaderreger: Die Viren führen bekanntlich nicht unmittelbar zum Tod des Schädlings, so daß dieser seine Fraßtätigkeit noch einige Zeit ausüben kann. Durch Einbau von Genen zur Produktion von Toxinen in das Virus-Genom könnte jedoch diese Zeit verkürzt werden.
- c) Erhöhung der Stabilität: Viren werden durch eine Reihe von Umweltfaktoren, insbesondere aber durch die UV-Strahlung der Sonne inaktiviert. Die Produktion von Schutzstoffen könnte ihre Fähigkeit zur Persistenz im Freiland und bei der Lagerung verbessern.

Da die solchermaßen veränderten Baculoviren nicht wie die Expressionsvektoren in vitro zum Einsatz kommen, sondern für eine Freisetzung vorgesehen sind, müssen mit einer Ausbringung verbundene potentielle Risiken genau bekannt sein. Bis heute stehen zwar noch keine Viren mit auf gentechnischem Wege veränderten Eigenschaften zur Verfügung. Erste Versuche zur Abschätzung des Risikos bei der Verwendung der genmanipulierten Viren im Pflanzenschutz sind aber schon in die Wege geleitet worden, um Daten als Entscheidungshilfe in entsprechenden Zulassungsanträgen zu erarbeiten. Über die ersten derartigen Versuche berichtet der Artikel von R. Possee in diesem Band.

LITERATUR

1. BBA: Verfahren und Prüfungen für die Beurteilung möglicher Risiken insektenpathogener Viren als Pflanzenschutzmittel. Merkblatt Nr. 59, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig (1983), 9pp.
2. Brusca, J., Summers, M., Couch, J., and Courtney, L.: *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus efficiently enters but does not replicate in poikilothermic vertebrate cells*. Intervirol. 26 (1986), 207 - 222
3. Burges, H.D., Croizier, G., and Huber, J.: A review of safety tests on baculoviruses. Entomophaga 25 (1980), 329 - 340
4. Dickler, E., und Huber, J.: Das Apfelwickler-Granulosevirus: Stand der Forschung und Möglichkeiten seiner Einführung in die Obstbaupraxis. Gesunde Pflanzen 36 (1984), 285 - 289
5. Falcon, L.A.: Economical and biological importance of baculoviruses as alternatives to chemical pesticides. In: Proc. Symp. "Safety Aspects of Baculoviruses as Biological Insecticides". 13.-15. Nov. 1978, Jülich, 27 - 46, Bundesministerium für Forschung und Technologie, Bonn (1980)
6. Granados, R.R., and Williams, K.A.: In vivo infection and replication of baculoviruses. In: The Biology of Baculoviroses. Vol. I. Biological properties and Molecular Biology. (R.R. Granados and B.A. Federici, eds.) 89 - 108. CRC Press, Inc., Boca Raton (1986)
7. Gröner, A.: Specificity and safety of baculoviruses. In: The Biology of Baculoviruses. Vol. I. Biological Properties and Molecular Biology. (R.R. Granados and B.A. Federici, eds.), 177 - 202. CRC Press, Inc., Boca Raton (1986)
8. Huber, J.: Use of baculoviruses in pest management programs. In: The Biology of Baculoviruses. Vol. II. Practical Application for Insect Control. (R.R. Granados and B.A. Federici, eds.), 181 - 202. CRC Press, Inc., Boca Raton (1986)
9. Huber, J.: Hochselektive Pflanzenschutzmittel am Beispiel der Insektenviren. In: Biologischer Pflanzenschutz. Schriftenreihe des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. Reihe A: Angewandte Wissenschaft, Heft 344, 73 - 80, Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup (1987)

10. Ignoffo, C.M.: Evaluation of in vivo specificity of insect viruses. In: *Baculoviruses for Insect Pest Control: Safety Considerations*. (M. Summers, R. Engler, L.A. Falcon, P.Vail, eds.), 52 - 57, American Society for Microbiology, Washington (1975)
11. Jaques, R.P.: Stability of entomopathogenic viruses. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 10(3) (1977), 99 - 116
12. Martignoni, E.M., and Iwai, P.J.: A catalog of viral diseases of insects, mites and ticks. *Gen. Tech. Rep. PNW-195*, USDA, Forest Service, (1986), 51 pp.
13. Matthews, R.E.F.: Classification and nomenclature of viruses. *Intervirol.* 12 (1982), 1 - 199
14. Oberhofer, H.: Spinnmilben - ein Folgeschädling unserer Pflegemaßnahmen. *Obstbau Weinbau, Mitt. Südtiroler Beratungsring* 20(4) (1983), 25 - 21

Tab. 1: Übersicht über die bei Insekten vorhandenen Virusfamilien mit Beispielen von wirbeltier- und pflanzenpathogenen Viren aus diesen Familien

Virus-Familie	Insetktenviren	Wirbeltierviren (Beispiele)	Pflanzenviren (Beispiele)
Baculoviridae	Kerpolyederviren Granuloseviren		
Iridoviridae	Iridescentviren	Afrik. Schweinefieber Froschviren	
Parvoviridae	Densoviren	Aleutengeschwür (Nerz) Gastrorenteritis (Mensch)	
Picornaviridae	Cricet-Polymerivirus	Polio (Mensch) Maul- und Klauenseuche	
Poxviridae	Entomopoxviren	Pocken (Mensch) Myxomatose (Kaninchen)	
Reoviridae	Cytoplasmapolyederviren	Rotaviren (Mensch) Blauzungengeschwür (Schaf)	Rauverzergung (Mais) Fijikrankheit (Gramineen)
Rhabdoviridae	Sigma-virus	Tollwut Stomatitis (Rind)	Gelbverzergung (Kartoffel) Gelbverzergung (Zuckerrübe)
Togaviridae	Arboviren	Gelbfieber (Mensch) Zeckenenzephalitis	

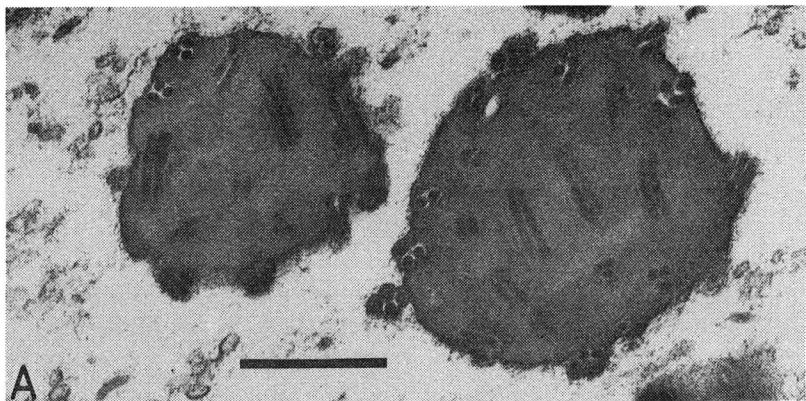
Tab. 2: Wirtsspezifität von Baculoviren: Zusammenstellung von Laborversuchen zur Übertragung von Baculoviren auf einen anderen Insektenwirt aus derselben oder einer anderen Familie [7]

neuer Wirt	aus derselben Familie	aus anderer Familie
Granuloseviren	35/15*	24/0
Kernpolyederviren	124/85	67/27

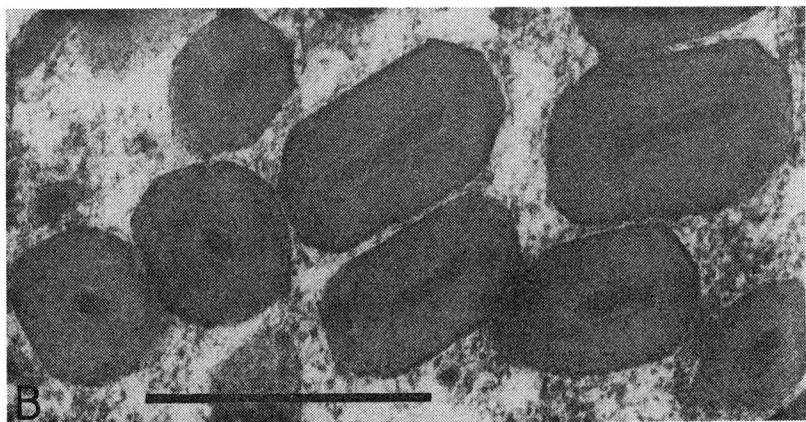
*) Anzahl versuchter Übertragungen / Anzahl erfolgreicher Übertragungen

Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Baculoviren. Länge des Vergleichsmaßstabs 500 nm. (Photos A.M. Huger):

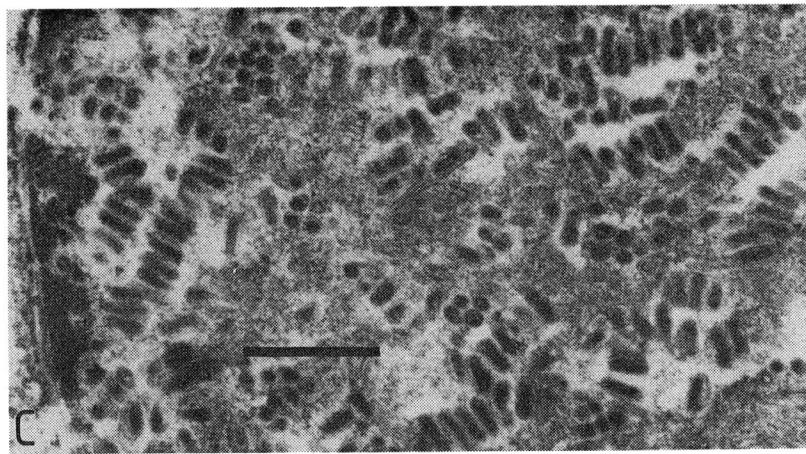
- A. Kernpolyedervirus der Kohleule, Mamestra brassicae während der Polyederbildung. Die Einbettung der im Bild längs und quergeschnittenen Bündel von Nucleocapsiden in die Proteinmatrix ist deutlich zu sehen.
- B. Granulosevirus des Apfelwicklers, Cydia pomonella. Fertig ausgebildete Einschließungskörper mit jeweils einem einzelnen Nucleocapsid.
- C. Baculovirus ohne Einschließungskörper aus dem Mitteldarm des Nashornkäfers, Oryctes monoceros.



A



B



C

Experiences with the First Field Release of Genetically Engineered Viruses

R. D. Possee, I. R. Cameron, C. J. Allen and D. H. L. Bishop

INTRODUCTION

The use of viruses as an alternative to chemical insecticides has focussed primarily on the Baculoviridae. A joint WHO-FAO meeting on insect viruses [18] endorsed the potential of baculoviruses as field control agents. In particular the baculoviruses were noted for their good storage properties, safety, relative ease of production and wide distribution among insects. The safety aspect is of paramount importance and the baculoviruses are unique in that they only infect arthropods. None of their members infects other invertebrates, or vertebrates, or plants. A summary of some of the baculoviruses which have been used for field control purposes is provided by Podgwaite [10].

The baculoviruses have a genome consisting of circular, covalently closed double-stranded DNA of between 100 and 150 kilobase pairs (kbp). This molecule is packaged into a rod-shaped nucleocapsid which is surrounded by a lipoprotein envelope to form the virus particle. In some of the viruses the enveloped particles are occluded by protein to form the polyhedron or granule. Based on morphological considerations the baculoviruses are divided into three subgroups. Subgroup A comprises the nuclear polyhedrosis viruses (NPVs). Groups of enveloped viruses are embedded in a proteinaceous polyhedral inclusion body that consists almost entirely of the polyhedrin protein (29 k). These occluded virus particles may contain a single (SNPV) or multiple (MNPV) nucleocapsids. Each form is genetically determined. The MNPVs only infect Lepidoptera while the SNPVs infect both Lepidoptera and Hymenoptera. Subgroup B baculoviruses comprise the granulosis viruses, their host range is confined to Lepidopteran species. The occlusion bodies or granules usually package a single virus particle which contains one nucleocapsid. The major occlusion body protein, while of similar size to the polyhedrin of the NPVs is known as granulin. The virus particles of subgroup C viruses contain a single nucleocapsid but

do not form occlusion bodies. The most well characterised example is the virus from the Orytes rhinoceros beetle. They will not be considered further in this report.

The principal target of the baculoviruses is the larval stage of the insect life cycle, probably because this is the major feeding stage. Virus occlusion bodies are ingested with the diet and dissolve on reaching the alkaline environment of the midgut. This releases a burst of infectious virus particles which negotiate the peritrophic membrane and fuse with the microvilli on the columnar or epithelial cells. Thereafter, the virus DNA is transported to the nucleus and replication ensues. In Lepidoptera the virus particles released from these cells spread the infection to the rest of the insect larva via the haemocoel. However, in Hymenoptera the replication is confined to the midgut cells with the formation of mature polyhedra late in infection, accompanied by severe damage to the gut wall.

Infected insects commonly exhibit behavioural abnormalities which may be of benefit to the subsequent spread of virus to other larvae. For example, they may ascend to shoot and plant tips prior to death thus facilitating distribution of the virus over the foliage below. Virus is released from decaying corpses and distributed primarily by rain splash and other physical means. The impact of baculoviruses on insect populations is greatly affected by their capacity to retain infectivity and to remain in a situation where they can infect a new host. The prolonged presence of infectious baculoviruses on plant surfaces between host generations is probably a result of release of occlusion bodies from slowly decaying larval corpses. Once released onto leaf surfaces, baculoviruses are subject to physical loss and degradation as well as ultraviolet light induced inactivation (290 - 315 nm). The polyhedrin protein probably gives a degree of protection against ultraviolet light inactivation and the ability of the virus to be retained on particular surfaces. Baculoviruses may persist for several years in the soil but this is of little benefit to the virus if it does not encounter the host insect. The subject of insect virus persistence in the environment has been reviewed [2].

Despite the apparent advantages of baculoviruses as insecticides some consideration must also be given to their disadvantages. Two known problems and one potential difficulty have been indentified.

Firstly the viruses have to be produced in a biological system. Viruses can be produced either in caterpillars infected in the laboratory after rearing as continuous cultures of insects on artificial diet, or simply collected from field specimens which have suffered a natural infection. The latter option suffers the major disadvantage of relying on convenient outbreaks of virus disease. Alternatively the virus can be grown in cell cultures, but this method is regarded as prohibitively expensive. Clearly developing a baculovirus insecticide requires a host insect which can easily be reared in the laboratory on artificial diet and gives a high yield of virus after infection.

Secondly there is a delay between the time of virus administration and larval death. For chemical insecticides this delay is usually minimal, perhaps a matter of hours; for virus insecticides there is an increased delay since the virus has to multiply in the target species before death occurs. Depending on the virus, the host and environmental conditions (temperature etc.) this lag phase may be several days, possibly weeks, during which time crop damage continues as the larva feeds. In a forest crop, such as pine, this limited damage may be acceptable but with some crops, for example fruit, cosmetic damage is economically disastrous.

The third potential problem concerns the induction of host resistance to the virus. Although immunological memory is not known to be present in insects, rearing of insects in the laboratory over a long period (10 years) at Oxford has resulted in a decreased susceptibility to virus infection compared with individuals of the same species collected in the wild. It can be argued that inducing resistance in wild populations will be no more than that which occurs in Nature during the usual epizootics of virus infection. The development of virus resistance in natural populations of insects has not been observed in studies carried out by Oxford staff using the Panolis flammae and Neodiprion sertifer NPVs as pesticides. However, if resistance developed then it could prejudice the continued use of a particular virus insecticide. Experience with chemical insecticides has shown that resistance to a particular product is selected in populations.

Given these three reservations in the use of baculoviruses as insecticides it is pertinent to consider how genetic engineering techniques may help to circumvent them. The question of delayed action of the virus insecticide might be resolved by inserting a gene encoding an insect specific toxin such as that from Bacillus thuringiensis into the virus genome. Expression of this toxin in the virus-infected insect could be expected to hasten the death of the insect, although resistance to the toxin might be acquired. Alternatively a gene encoding a hormone or enzyme from the insects own metabolic pathways could be incorporated and on expression in the insect, create a potentially lethal imbalance in the host. The advantage of this latter approach is that the insect would be unlikely to develop resistance against a component of its own system. The problem of the production of these viruses could also be solved by genetic manipulation since the dose of the modified virus required to kill the host may be lower than that for the wild type virus, thus reducing the amount used in a spray programme.

However, we consider that it would be irresponsible to construct such recombinant viruses and apply them to the environment without a thorough understanding of the consequences of such action. Particular attention must be paid to the host range of the modified virus and whether previously unsusceptible insects become liable to infection. This is of concern where there is a rich local insect fauna associated with the target pest. Another consideration

is the likely spread of the virus from the initial site of application. This may be mediated by environmental conditions such as wind, or adult airborne insects. Alternatively vertebrates such as birds, which feed on the larvae, may imbibe large quantities of the virus which can pass largely unscathed through the digestive system and remain infectious. While such problems may be addressed by studying the spread of released natural viruses it is not possible to distinguish between the released viruses and virus endogenous to the environment without laborious analyses of virus DNA using restriction endonucleases. Latent viruses are known to be stressed out of an insect host after it is challenged with a different virus [7]. Consequently it is not possible to accurately predict the fate of a virus deliberately released into the environment. Such knowledge is essential if the fate of a released, genetically engineered virus is to be determined. Therefore, we have embarked upon a cautious, stepwise programme to determine the likely risks and hazards associated with the use of genetically engineered virus insecticides.

Our strategy has been to produce recombinant baculoviruses which have only minor changes in their genomes but which can be distinguished from other viruses already present in the environment. To achieve this goal we have inserted a synthetic 80 base pair oligonucleotide (marker) into the genome of the Autographa californica (Ac) MNPV. The marker has translation stop codons in all six reading frames and no other genetic signals likely to affect the replication of the virus. It neither adds to, nor detracts from, any natural virus gene product. The polyhedrin gene of the AcMNPV has been mapped on the virus genome in previous studies [1, 14, 16] and subsequently sequenced [4]. The 5' and 3' ends of the mRNA have been determined [5] together with an analysis of the promoter sequences required for the high level expression of the polyhedrin gene, or foreign genes inserted in its place [9, 12]. Consequently the polyhedrin is perhaps the most well characterised of all the baculovirus genes. Furthermore, it has proven possible to delete this gene and still produce infectious virus, albeit non-occluded [15]. Foreign genes have been inserted in lieu of the polyhedrin coding sequences but under the control of its promoter, thus facilitating high level expression of the recombinant protein [8]. This depth of knowledge makes the polyhedrin gene the site of choice for introducing a marker element into the virus genome.

The marker was placed in the genome after the end of the polyhedrin gene coding sequences but within the 3' non-translated sequences. We have assessed the effect of this addition to the genome of AcMNPV on host range and persistence in soil in the laboratory. After consultation with the appropriate regulatory authorities and obtaining their approval, the virus was released into the environment in a netted enclosure together with Spodoptera exigua larvae on sugar beet plants. The effect of the virus on the target pest was monitored and its persistence in the soil was determined after the insects were removed from the site.

METHODS

Cells and Virus

Spodoptera frugiperda IPLB-Sf-21AE cells and AcMNPV were propagated as described previously [11].

Insects

Laboratory cultures of some insects (e.g. Trichoplusia ni and Spodoptera exigua) were maintained on a modification of Hoffman's Tobacco hornworm diet [6]. Other species, not normally reared in the laboratory, were collected as adults in the field and used to initiate small colonies which were maintained on natural diet. Larvae were fed virus by contaminating a small portion of diet (artificial or natural) with a defined dose and ensuring that the individual larva had consumed it before transferring to fresh material.

Analysis of DNA in agarose gels

Plasmid or virus DNA was digested with restriction enzymes using conditions recommended by the supplier (BRL) and analysed in agarose gels as described previously [11].

Synthesis of the marker oligonucleotide

A 90 base synthetic oligonucleotide was designed with translation stop codons in all six reading frames and no other transcription regulatory signals. This was synthesised by Applied Biosystems Ltd. (USA). The single strand was converted to a duplex molecule by priming with a 20 base oligonucleotide at one end and extending with Klenow enzyme. The completed double strand was then inserted into a pUC8 vector at the Sma I site and propagated in E. coli JM105 cells. The marker sequence was purified from the plasmid as a Bgl II-BamH I fragment and inserted into the BamH I site of pAcRP61, which lacks the polyhedrin coding sequences and thus placed the marker in the 3' non-coding sequences [9]. The orientation was selected such that after digestion with BamH I, the marker remained attached to the polyhedrin 3' non-coding sequences of the vector. This plasmid was designated pAcRP61-M.

Construction of plasmid containing the polyhedrin gene and marker oligonucleotide

The polyhedrin gene of AcMNPV is contained within the EcoR I fragment I. This was inserted into the EcoR I site of a modified pUC8 vector lacking the remainder of the polylinker cloning sites [11]. This plasmid was digested with SnaB I (at position 932 in Fig. 1) and the DNA treated with Bal 31 exonu-

please to progressively remove sequences in the 3' non-coding region of the polyhedrin gene. The deleted molecules were treated with S1 nuclease to produce blunt ends, ligated with Bgl II linkers and used to transform *E. coli* JM105 cells. Recombinants were selected with a deletion about 26 nucleotides downstream from the polyhedrin coding sequences (i.e. deletion was in the opposite direction to pAcRP61). The complete polyhedrin gene was excised from this plasmid as a Xho I-Bgl II fragment and inserted into the Xho I-BamH I pAcRP61-M vector fragment to produce a plasmid containing the complete polyhedrin gene with the element at its 3' end. The marker element now consisted of 80 nucleotides of foreign sequences.

Diagnosis of polyhedra

Polyhedra in infected larvae were detected using the staining techniques described by Wigley [19].

Dot blot hybridisation analysis of DNA from larvae

Larvae were macerated in 300 µl of water, 200 µl 0.1 M Na₂CO₃ was added and incubated at 37°C for 5 min to dissolve polyhedra. Sodium dodecyl sulphate was added to 0.2%, 2-mercaptoethanol to 5 mM and ribonuclease A to 100 µg/ml. This mixture was incubated at 37°C 30 min before extraction with phenol/ chloroform (1:1) to remove the protein. The DNA was precipitated from the aqueous phase with ethanol, pelleted and resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA (TE). Dot blot hybridisation was carried out as described previously [13] using a polyhedrin specific, nick translated radiolabelled probe consisting of the cloned AcMNPV Hind III 'V' fragment or the marker oligonucleotide radiolabelled at its 5' ends with polynucleotide kinase [5].

Construction of recombinant viruses

A polyhedrin deficient mutant virus was constructed as described by Smith and associates [15]. This virus lacked the 5' end of the polyhedrin gene from the transcription start site to the BamH I site at position 257 (Fig. 1) and consequently could not produce polyhedrin protein. DNA purified from this virus [11] was used in cotransfection experiments with the plasmid containing the complete polyhedrin gene and marker element. Successful recombination was detected by the formation of mature polyhedra in infected cells. These viruses were plaque purified to remove contaminating polyhedrin-minus viruses and then propagated in cells or insects as required.

RESULTS

Construction of a genetically marked AcMNPV

A 90 base synthetic oligonucleotide was purchased from Applied Biosystems. This was converted to a double stranded molecule by annealing with a 20 base oligonucleotide of complementary sequence to the 3' end of the 90 mer and extending with Klenow enzyme. The full length copy was inserted into a plasmid vector and multiplied to high copy number in bacterial cells. The marker was then excised from the plasmid with restriction enzymes and inserted into a site at the 3' end of the AcMNPV polyhedrin gene contained within another plasmid. The arrangement of the marker relative to the polyhedrin gene is shown in Figure 1. The location of the polyhedrin gene in the virus genome is shown in Figure 2, where the restriction map of the virus DNA is presented in a circular form [17]. This modified polyhedrin gene was inserted into the complete virus genome by carrying out cotransfection with infectious virus DNA from a polyhedrin negative mutant containing a deletion in the 5' end of the polyhedrin gene; this prevented it from synthesising polyhedrin protein. Replacement of the deleted sequences with the complete polyhedrin gene plus marker rescued the occlusion negative virus and produced normal polyhedrin positive viruses. These viruses were further purified to genetic homogeneity using plaque assay techniques. DNA was extracted from the virus and analysed using restriction endonucleases. Figures 3 shows virus DNA from the marked, and unmodified AcMNPVs digested with Hind III and fractionated in a 0.6% agarose gel. The effect of the addition of the marker element can clearly be seen as the band indicated by the arrow head in the parent virus comigrates with 2 larger bands in the marked virus to form a triplet. Polyhedra were isolated from the infected cells and used to infect Trichoplusia ni larvae to produce larger quantities of occlusion bodies. These were used in all the subsequent safety tests.

Stability of the marked AcMNPV

The marked, polyhedrin-positive virus was passaged in S. frugiperda cells using standard plaque assay techniques for some 50 replication cycles. It was also passaged in T. ni larvae. By both procedures no change in genotype was detected as determined by analysis with restriction enzymes. The marker element itself also remained stable as determined by sequence analysis.

Host range testing with the genetically marked AcMNPV

It was predicted from the design of the synthetic oligonucleotide and its position within the virus genome that it would not in any way affect the replication of the marked virus or its host range. This was tested by performing infectivity studies with a large number of insect species which are not normal-

ly susceptible to AcMNPV. The species used were chosen after consultation with the Nature Conservancy Council. Particular attention was paid to species which might be local to the proposed release site of the marked virus. Insects were collected as adults in the field and used to initiate small colonies in the laboratory on natural foliage. Larvae in the third instar of development were fed marked AcMNPV or the parental virus at doses of 10^2 - 10^6 polyhedra per microliter (in 10-fold dilution steps). Thirty larvae were used for each dose. The larvae were maintained at 28°C for up to 24 h until each larvae had consumed the virus-contaminated diet, transferred to fresh diet and observed daily to record deaths. The experiment was terminated when all the larvae had either died or pupated.

If sufficient of the larvae had perished the data was used to calculate a lethal dose using probit analysis [3]. This was only possible in the tests performed with *T. ni* and *S. exigua* which gave LD₅₀ values of 10^2 and 10^5 respectively.

Frequently, only a few larvae succumbed to the virus and a different method was required to assess the extent of infection. First, small portions of apparently uninfected larvae and pupae were smeared onto microscope slides and stained with Giemsa to detect polyhedra. These are easily visible under the light microscope. Secondly, DNA was extracted from the remaining material from each insect. This was used in dot blot hybridization tests with a radiolabelled DNA probe specific for the marker element within the virus genome. An example of such a test is shown in Figure 4 where DNA from *Sphinx ligustri* (Privet Hawk moth), challenged with the marked AcMNPV, was probed with the radiolabelled marker oligonucleotide. At a dose of 10^6 polyhedra all of the insects were positive for the virus. At 10^5 polyhedra, 3 of the insects were positive and this reduced to 2 at a dose of 10^4 . Control insects which were fed similar doses of the virus and then harvested 1 day later did not show evidence of virus infection. This demonstrates that the positive results described above were due to virus replication and not a consequence of the high doses fed to the insects. Uninfected insects showed no sign of virus infection.

Samples were also probed with radiolabelled polyhedrin gene sequences to determine whether insect deaths were due to some other baculovirus present in a latent state prior to inoculation with the marked AcMNPV but stressed out after infection. Definitive deaths due to infection with the marked virus were characterised by the DNA samples reacting positively to both probes. The data from these experiments are presented in Table 1 where a list of the 86 species tested is given. Only three UK species were found to be susceptible to the marked virus, the Lime and Privet Hawk moths and the Small Mottled Willow which was our insect of choice for the field experiments. An identical host range was found in tests with the unmarked parental virus.

Survival of the marked virus in soil

It was anticipated that the release of the marked virus into the environment would result in contamination of the soil at the release site as polyhedra were washed from leaf surfaces and the corpses of larvae which had died of virus infection. Therefore, some estimate had to be made as to the likely persistence of this virus in the soil and whether steps would have to be taken to de-contaminate the field site after the experiment. Soil was collected from the proposed field site and steam sterilised. Polyhedra from the marked virus stock were mixed with soil and left at room temperature for two weeks. Samples were taken throughout this period and tested for residual virus infectivity using *T. ni* insect larvae as a biological indicator. There was no significant decline in virus infectivity over the period of the experiment.

Approval for the field release of a genetically marked AcMNPV

Before embarking on the field trials with this genetically engineered virus, approval was sought from a number of interested parties. These included the U.K. Advisory Committee for Genetic Manipulation; Health and Safety Executive; Nature Conservancy Council; Department of the Environment; Ministry of Agriculture Fisheries and Food; Natural Environment Research Council and the Forestry Commission. The Environmental Health Officer of the district, site scientists of the field station and staff of the "Friends of the Earth" organisation were informed of the planned release. The public were informed via press releases and the normal media channels (radio, television and papers).

The proposed host insect for the marked AcMNPV

The target insect to be used for the field trial was the small mottled willow (*S. exigua*). This is a noctuid moth with practically a world-wide distribution and is a seasonal immigrant to the U.K. It eats a wide range of herbaceous dicotyledons. The host has a wide distribution in communities of slow growing plants, both wild and cultivated. Larvae of this moth pass through 5 instars. In previous tests the marked AcMNPV was found to have an LD₅₀ about 10⁵ polyhedra.

Field Site

The proposed site for release of the marked virus was situated in a field of light loam bounded by agriculture and woodland at the Oxford University field station. The area has been extensively studied with regard to fauna and flora for many decades. The nearest human population, apart from the field station itself, is some 0.5 mile distant. A plan and elevation of the facility are shown in Figure 5. A 10 meter square, netted, insect proof enclosure was constructed surrounded by a wire fence to prevent access by large animals.

The netted facility was proof against arthropods either entering or leaving. Within the netted facility a 4 meter square plot surrounded by a 50 cm high plexiglass all with an upper encompassing oil trough was constructed. The plexiglass was inserted 25 cm into the soil to prevent entry or egress of larvae or other arthropods. This plot was planted with sugar beet for the field release experiment.

Release to the environment

Spodoptera exigua larvae in the third instar were fed 10^5 polyhedra incorporated into an artificial diet plug. The infected larvae (ca. 200) were then placed on the sugar beet plants in the central, plexiglass enclosed, area of the containment facility (Fig. 5). Uninfected larvae were also released onto nearby plants, similarly enclosed, to monitor spread of the virus. After one week none of the infected caterpillars remained alive. Dead caterpillars were evident on many of the plant surfaces (estimated to be ca. 55). Other dead caterpillars were observed in, or on the surface of the soil. Samples of contaminated foliage were returned periodically to the laboratory for analysis.

In the completely netted enclosure where uninfected caterpillars were placed the larvae consumed substantial quantities of foliage for three weeks after the release. After this time most of the caterpillars were removed, all the plants destroyed (autoclaved) and the site flooded with water to retrieve all the pupae. Virus was never isolated from this area. This site was eventually disinfected (see below).

In the area where infected caterpillars were released, plant material, (whole plants, or leaves of the sugar beet and cabbages as well as chickweeds that grew within the facility subsequent to the release) were recovered, and brought back at 1-2 week intervals to the laboratory. This process was repeated throughout a 6 month period. Virus was assayed on the foliage by allowing groups of permissive I. ni larvae (2nd instar) to completely eat the plants. The larvae were then reared on artifical diet until pupation or death, then assayed for virus (polyhedra, DNA probing). Although, as expected for plants that had only a limited number of infected larvae on them, not all the plant samples were positive for virus, over the entire 6 month period virus was identified both on plants that were present in the site at the initiation of the experiment, as well as those (i.e., weeds) that grew up in the facility after the experiment had been initiated and after the caterpillars had died. The amounts of virus on the infected plants or in the soil were not quantitated. Chickweed recovered from outside the facility did not yield virus. Virus persistence was assessed by regular collection of foliage samples (sugar beet and cabbage) from the field site and feeding them to I. ni larvae in the laboratory to act as a biological detection system. Virus recovered from the field site after replication in the larvae retained the marker elements in its original form.

Survival of marked AcMNPV on leaf surfaces

In order to estimate the survival of polyhedra on leaf surfaces a separate experiment was conducted. In an area of the netted enclosure apart from the central area used for the release in larvae, duplicate plots of cabbage were treated with the marked virus at increasing concentrations (Fig. 6). Leaves from plants in each of these plots were harvested at weekly intervals and fed to *T. ni* larvae in the laboratory to determine the inactivation of the virus. The rate of virus inactivation estimated from this experiment was found to be greater than 1 log of infectious virus per week.

Disinfection of the field site and subsequent monitoring

After completion of the experiment to determine the persistence of the marked virus in February 1987 the field site was cleared and the foliage removed and sterilized to destroy any remaining virus. The cleansing of the soil posed a more difficult problem since it was not feasible to remove and steam sterilize. Therefore, an alternative procedure was adopted which consisted of treating the site with 5% formalin on three separate occasions, twice in February and again in March 1987. This solution is known to inactivate polyhedra very effectively. Soil samples were taken before and after each treatment and used in the laboratory to propagate 200-400 cabbage seedlings. The cabbage were fed to *T. ni* larvae which acted as biological indicators. Any virus remaining in the soil would contaminate the seedlings and after consumption by the insect cause death in the usual way. All insects, infected or healthy, were processed to detect the presence of the marked virus as described above in the host range tests. The result showed that before the first formalin treatment infectious virus was present in the soil. After the third treatment no virus was detected and all insects fed on the cabbage remained healthy, pupated as normal and did not contain marked virus. These tests demonstrated that virus had survived in the soil throughout the 6 month period and that the site was successfully disinfected by the formalin treatment.

DISCUSSION

A genetically marked baculovirus was constructed containing a unique oligonucleotide which allowed us to distinguish it from any other baculovirus, including the unmodified parental AcMNPV, using dot blot hybridization techniques. This marker element, inserted in the 3' non-coding region of the polyhedrin gene, did not affect the replication of the virus in cell culture of insects. Furthermore, its design was such that it did not alter the synthesis of any other virus gene products. After passage in cell culture and insects the marker remained stable and it is predicted that it should remain so indefinitely.

The host range of the marked virus compared with the parental virus was assessed by challenging 86 different species of insects with each virus. Most of these insects were not susceptible to either virus. The Lime and Privet Hawk moths succumbed, but only at very high doses. The small mottled willow (S. exigua) was also susceptible to AcMNPV and was used as the host insect for the later field release.

Prior to the field release of the marked virus the likely persistence of the virus in soil was determined. Studies in the laboratory showed that the marked virus was not affected by a period of two weeks in contact with soil, retaining full infectivity after this time. This result was of importance to the strategy planned for the field release since the site had to be completely cleared of the virus at the termination of the experiment. It was deemed inevitable that the soil would become contaminated with virus.

Approval for the release of the marked virus was obtained from a number of regulatory authorities and interested parties. The design of the field site and necessary safety tests required prior to release were drawn up during these consultations. The marked virus was released into the field site in September 1986 by infecting S. exigua larvae in the laboratory and then placing them in a contained facility on sugar beet inter-planted with cabbages. The insects died from the virus infection after 3 weeks. Virus was recovered from plant surfaces and the soil over a 6 month period after the release, demonstrating the resistance of baculoviruses to environmental conditions. The site was only cleared of the marked AcMNPV after flooding the area with formalin which inactivated the remaining virus. In a separate experiment virus was spread onto cabbage leaves and the rate of inactivation assessed over a period of weeks. Approximately 1 log of infectious virus was lost per week. Whether this was due only to the effects of ultra-violet light or to possible virucidal substances on the leaf surface is not known.

In summary the results from this study demonstrate that an innocuous genetic marker is a suitable tool for the identification of a genetically engineered virus released into the environment. The results will be a suitable baseline for further studies with genetically engineered viruses which have been altered to render them more susceptible to inactivation in the environment and later studies which will incorporate insect specific toxins or hormones to improve the speed of action of the virus insecticides.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr C. Rivers and Mr M. Hirst for their assistance in collecting the insects for the host range studies. The photographic skills of Mr C.D. Hutton are also gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Adam, M.J., and Miller, L.K.: Molecular cloning of DNA complementary to mRNA of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: Location and gene products of RNA transcripts found late in infection. *J. Virol.* 44, (1982) 782 - 793
2. Evans, H.F., and Harrap, K.A.: Persistence of Insect Viruses. In: *Virus Persistence* (A.C. Minson and G.K. Darby, eds.) S.G.M. Symposium 33, 57 - 96. Cambridge University Press, (1982)
3. Finney, D.J.: *Probit Analysis*. Cambridge University Press (1971)
4. Hoot Van Iddekinge, B.J.L., Smith, G.E., and Summers, M.D.: Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 131, (1983) 561 - 565
5. Howard, S.C., Ayres, M.D., and Possee, R.D.: Mapping the 5' and 3' ends of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus polyhedrin mRNA. *Virus Res.* 5, (1986) 109 - 119
6. Hunter, F.R., Crook, N.E., and Entwistle, P.F.: Viruses as pathogens for the control of insects. In: *Microbial Methods for Environmental Biotechnology* (J.M. Grainger and J.M. Lynch, eds.) 323 - 347. Academic Press, New York, (1984)
7. Longworth, J.F., and Cunningham, J.C.: The activation of occult nuclear polyhedrosis viruses by foreign nuclear polyhedra. *J. Invert. Path.* 10 (1968) 361 - 367
8. Luckow, V.A., and Summers, M.D.: Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Biotechnology* 6, (1988) 47 - 55
9. Matsuura, Y., Possee, R.D., Overton, H.A., and Bishop, D.H.L.: Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J. gen. Virol.* 68, (1987) 1233 - 1250
10. Podgewaite, J.D.: Strategies for field use of baculoviruses. In: *Viral Insecticides for Biological Control* (K. Maramorosch and K.E. Sherman, eds.) 775 - 797. Academic Press, New York (1985)

11. Possee, R.D.: Cell surface expression of influenza virus haemagglutinin in insect cells using a baculovirus vector. *Virus Res.* 5, (1986) 43 - 59
12. Possee, R.D., and Howard, S.C.: Analysis of the polyhedrin gene promoter of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Nuc. Acids. Res.* 15, (1987) 10233 - 10248
13. Possee, R.D., and Kelly, D.C.: Physical maps and comparative DNA hybridization of Mamestra brassicae and Panolis flammea nuclear polyhedrosis virus genomes. *J. gen. Virol.* 69, (1988) 1285 - 1298
14. Rohel, D.Z., Chochran, M.A., and Faulkner, P.: Characterization of two abundant mRNAs of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus present late in infection. *Virology* 124, (1983) 357 - 365
15. Smith, G.E., Fraser, M.J., and Summers, M.D.: Molecular engineering of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus genome: Deletion mutations within the polyhedrin gene. *J. Virol.* 46, (1983) 584 - 593
16. Smith, G.F., Vlak, J.M., and Summers, M.D.: Physical analysis of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10,000-molecular weight protein. *J. Virol.* 45, (1983) 215 - 225
17. Vlak, J.M., and Smith, G.E.: Orientation of the genome of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: a proposal. *J. Virol.* 41, (1982) 1118 - 1121
18. WHO/FAO Expert Group (TRES): The use of viruses for the control of insect pests. *WHO Rech. Rep. Ser.* 531, (1973)
19. Wigley, P.J.: Diagnosis of virus infections-staining of insect inclusion body viruses. In: *Microbial Control of Insect Pests* (J. Kalmakoff and J.F. Longworth, eds.) New Zealand Department of Scientific and Industrial Research Bull. 228 (1980) 35 - 39

Table 1: Host range of occluded AdNPV * cont.

NON-PERMISSIVE SPECIES cont:

MOTH		
<u>Lasiocampidae</u>	<i>Malacosoma neustria</i> <i>Philudoria potatoria</i>	The Lackey The Drinker
<u>Lymantriidae</u>	<i>Dasychira pudibunda</i> <i>Daychira sp.</i> (Tenerife) <i>Euproctis chrysorrhoea</i>	Pale Tussock Brown Tail
<u>Noctuidae</u>	<i>Acronicta aceris</i> <i>Agrotis segetum</i> <i>Anaplectoides prasina</i> <i>Autographa pulchrina</i> <i>Autographa gamma</i> <i>Crambophora ligustris</i> <i>Diachrysia chrysitis</i> <i>Diarsia mendica</i> <i>Diatraxia olarecea</i> <i>Heliothis zea</i> <i>Mamestra brassicae</i> <i>Melanchnra persicariae</i> <i>Mythimna separata</i> <i>Noctua fimbriata</i> <i>Panolis flammea</i> <i>Peridroma saucia</i> <i>Phlogophora meticulosa</i> <i>Polia nebula</i> <i>Spodoptera littoralis</i> <i>Xestia baja</i> <i>Xestia c-nigrum</i>	The Sycamore Turnip moth Green Arches Beautiful Golden Y Silver Y The Coronet Burnished Brass Ingrailed Clay Bright Line Brown Eye Corn Ear Worm Cabbage moth Dot moth Rice Armyworm Broad-bordered Yellow Underwing Pine Beauty Pearly Underwing Angle Shades Grey Arches Mediterranean Brocade Dotted Clay Setaceous Hebrew Character
<u>Notodontidae</u>	<i>Cerura vinula</i> <i>Chaonia ruficornis</i> <i>Phalera bucephala</i> <i>Harpyia furcula</i>	Puss moth Lunar Marbled Brown Buff Tip Sallow kitten
<u>Saturniidae</u>	<i>Pavonia pavonia</i>	Emperor moth
<u>Sphingidae</u>	<i>Hyloicus pinastri</i> <i>Manduca sexta</i> <i>Laothoe populi</i> <i>Smerinthus ocellata</i>	Pine Hawk-moth Tobacco hornworm Poplar Hawk-moth Eyed Hawk-moth
<u>Yponomeutidae</u>	<i>Plutella xylostella</i>	Diamond Backed moth
<u>Zygaenidae</u>	<i>Zygaena filipendulae</i>	Sixspot Burnet

PERMISSIVE U.K. SPECIES:

<u>Sphingidae</u>	<i>Mimas tiliae</i> <i>Sphinx ligustri</i>	Lime Hawk-moth Privet Hawk-moth
<u>Noctuidae</u>	<i>Spodoptera exigua</i>	Small Mottled Willow

PERMISSIVE NON-U.K. SPECIES:

<u>Noctuidae</u>	<i>Heliothis armigera</i> <i>Spodoptera frugiperda</i> <i>Trichoplusia ni</i>	Cotton Bollworm Fall Army Worm Cabbage Looper
------------------	---	---

*) Species tested per os [doses 10^2 to 10^6 PIBS/individual] and infection monitored by appropriate DNA hybridization

Table 1: Host range of occluded AcNPV *

NON-PERMISSIVE SPECIES

BUTTERFLIES

<u>Hesperiidae</u>	<i>Thymelicus falvus</i>	Small Skipper
<u>Lycaenidae</u>	<i>Lycaea phlaeas</i> <i>Polyommatus icarus</i>	Small Copper Common Blue
<u>Nymphalidae</u>	<i>Aglais urticae</i> <i>Argynnis paphia</i> <i>Clossiana selene</i> <i>Cynthia cardui</i> <i>Inachis io</i> <i>Polygonia c-album</i> <i>Vanessa atalanta</i>	Small tortoiseshell Silver-washed Fritillary Small pearl bordered Fritillary Painted Lady Peacock Comma Red Admiral
<u>Pieridae</u>	<i>Pieris brassicae</i> <i>Pieris napi</i> <i>Pieris rapae</i>	Large White Green-veined White Small White
<u>Satyridae</u>	<i>Maniola jurtina</i> <i>Melanargia galathea</i> <i>Pararge aegeria</i> <i>Pyronia tithonus</i>	Meadow Brown Marbled White Speckled Wood Gatekeeper

MICROLEPIDOPTERA

<i>Cydia pomonella</i>
<i>Ephemerae chaerophyllella</i>
<i>Yponomeuta cagnegella</i>

HYMENOPTERA

<i>Nematus ribesii</i>
<i>Neodiprion sertifer</i>
<i>Gilpina hercyniae</i>

MOTHS

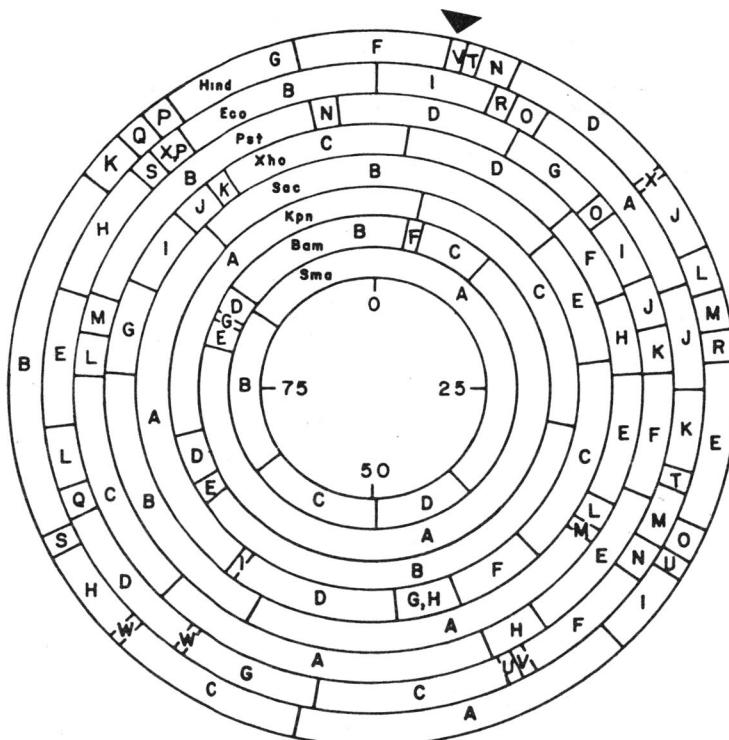
<u>Arcitiidae</u>	<i>Arcitia caja</i> <i>Spilosoma luteum</i> <i>Tyria jacobaeae</i>	Garden Tiger Buff Ermine The Cinnabar
<u>Drepanidae</u>	<i>Cilix glaucata</i>	Chinese Character

<u>Geometridae</u>	<i>Biston betularia</i> <i>Campaea margaritata</i> <i>Chloroclysta truncata</i> <i>Cyclophora albipunctata</i> <i>Cyclophora punctaria</i> <i>Ecliptopera silaceata</i> <i>Hemistiola chrysoprasaria</i> <i>Idaea versata</i> <i>Odontopera bidentata</i> <i>Operophtera brumata</i> <i>Opisthograptis luteolata</i> <i>Ourapteryx sambucaria</i> <i>Selenia dentaria</i> <i>Timandra griseata</i> <i>Xanthorhoe montanata</i> <i>Xanthorhoe fluctuata</i> <i>Xanthorhoe spadicearia</i>	Peppered moth Light Emerald Common Marbled Carpet Birch Mocha Maiden's Blush Small Phoenix Small Emerald Riband Wave Scalloped Hazel Winter moth Brimstone moth Swallowtail Moth Early Thorn Blood-vein Silver-ground Carpet Garden Carpet Red Twin-spot Carpet
--------------------	--	---

T →

GAGATAATTAAAATGATAACCCTCGCAAATAAAATAAGTATTTACTGTTTCGTAACA
 10 20 30 40 50 60
 M P D Y S Y R P T I G
 GTTTTGTAAATAAAAACCTATAAATATGCCGGATTATTCAACCGTCCCACCATCGGGC
 70 80 90 100 110 120
 R T Y V Y D N K Y Y K N L G A V I K N A
 GTACCTACGTGTACGACAACAAGTACTACAAAAAATTAGGTGCCGTTATCAAGAACGCTA
 130 140 150 160 170 180
 K R K K H F A E H E I E E A T L D P L D
 AGCGCAAGAACGACTTCGCCAACATGAGATCGAAGAGGCTACCCCTGACCCCCTAGACA
 190 200 210 220 230 240
 N Y L V A E D P F L G P G K N Q K L T L
 ACTACCTAGTGGCTGAGGATCCTTCTGGGACCCGGCAAGAACAAAAACTCACTCTCT
 250 BamH I 270 280 290 300
 F K E I R N V K P D T M K L V V G W K G
 TCAAGGAAATCCGTAATGTTAACCCGACAGATGAAGCTT, GTCGTTGGATGGAAGGAA
 310 320 330 340 350 360
 K E F Y R E T W T R F R M E D S F P I V N
 AAGAGTTCTACAGGGAAACTTGGACCCGCTTCATGGAAGACAGCTTCCCCATTGTTAACG
 370 380 390 400 410 420
 D Q E V M D V F L V V N M R P T R P N R
 ACCAAGAAGTGATGGATGTTTCTTGTCAACATGCGTCCACTAGACCCAACCGTT
 430 440 450 460 470 480
 C Y K F L A Q H A L R C D P D Y V P H D
 GTTACAAATTCTGGCCCAACACGCTCTGCGTTGCGACCCCGACTATGTACCTCATGACG
 490 500 510 520 530 540
 V I R I V E P S W V G S N N E Y R I S L
 TGATTAGGATCGTCGAGCTTCATGGGTGGCAGCAACAACGAGTACCGCATAGCCTGG
 550 560 570 580 590 600
 A K K G G G C P I M N L H S E Y T N S F
 CTAAGAAGGGCGGGCTGCCAACATGAAACCTTCACTCTGAGTACACCAACTCGTTCG
 610 620 630 640 650 660
 E Q F I D R V I W E N F Y K P I V Y I G
 AACAGTTCATCGATCGTGCATCTGGAGAACCTCTACAAGCCATCGTTACATCGGT
 670 680 690 700 710 720
 T D S A E E E I L L E V S L V F K V K
 CCGACTCTGCTGAAGAGGAGGAAATTCTCCTTGAAGTTTCCCTGGTGTCAAAGTAAAGG
 730 740 750 760 770 780
 E F A P D A P L F T G P A Y *
 AGTTTGACCCAGACGACCTCTGTTCACTGGTCCGGCGTATTAAAACACGATACATTGTT
 790 800 810 820 830 840
 ATTAGTCAGATCCTAGGCTCTAGGAGGGCTTATCCAGGGCTAGCCGGGACTCCTACCA
 850 860 870 880 890 900
 TTGACCTAGGTTAAAGCTCAGATCCGGTTATTAGTACAGCATTATTAAGCGCTAGATT
 910 920 930 940 950 960
 CTGTGCGTTGATTACAGACAATTGTTGACGTATTTAATAATTCTTAAATTAT
 970 980 990 SnaB I 1010 1020
 AATCTTCTGGTGGTATGTTAGAGCGAAAATCAAATGATTTCAGCGTCTTATATCTGA
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 ATTTAAATTTAAATCTCAATAGATTGAAATAGGTTTCGATTAGTTCAAACAAGGG
 1090 1100 1110 1120 1130 ▼ 1140
 GTCGATATTGCTTGTGTTTGTAAAGGTTGACGTCGTTCAAATATTG
 1150 1160 1170 1180 1190 1200

Figure 1: Nucleotide sequence of the AcMNPV polyhedrin gene and marker oligonucleotide. The position of the 80 base pair synthetic marker is indicated by the enclosed sequence from 847 to 928. The amino acid sequence of the polyhedrin is shown above the DNA sequence from 87 to 821. The transcription initiation site is indicated by 'T' and the horizontal arrow; the polyadenylation signal is underlined (1169 - 1174) and the transcription termination sites indicated by arrowheads (1195 and 1200). BamH I and SnaB I restriction sites are indicated.



Circular map of AcMNPV DNA

Figure 2: Physical map of the AcMNPV genome. The 128 kbp DNA molecule is depicted as concentric circles for each of the restriction enzyme sites. The position of the polyhedrin gene is indicated by the large arrow at the Hind III V fragment.

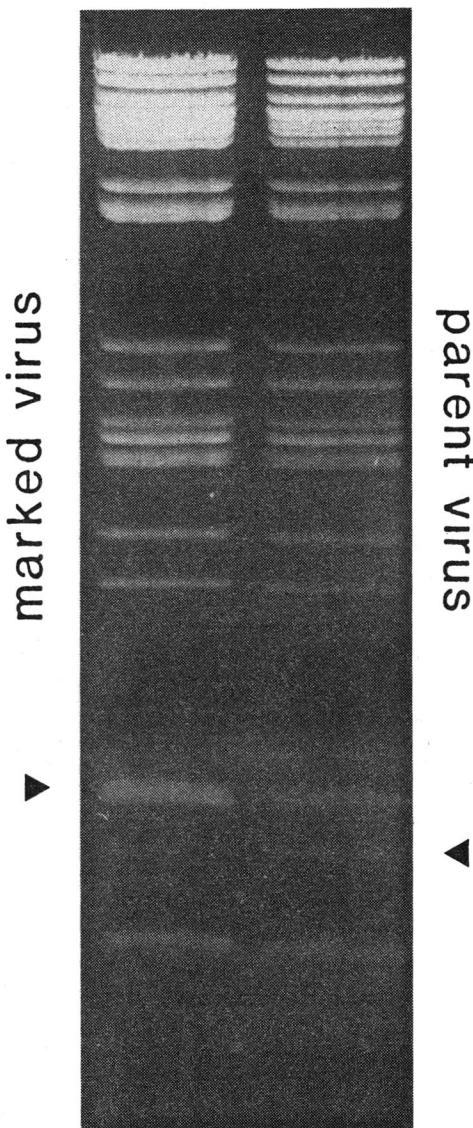
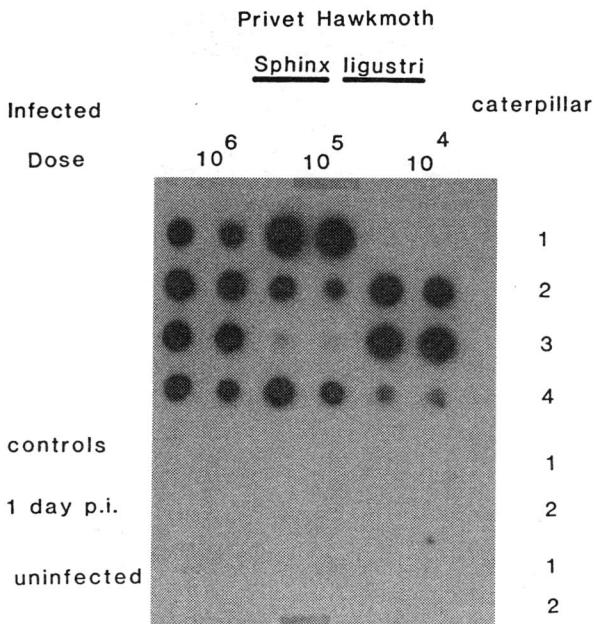


Figure 3: Restriction endonuclease analysis of virus DNA. DNA was purified from the marked and parental viruses, digested with Hind III and analysed in a 0.6% agarose gel. The normal position of the Hind III V fragment of the parental virus is indicated by the arrow in the right hand lane. After the addition of the oligonucleotide the same fragment comigrates with the T and U fragments indicated by the arrow in the left hand lane.



PROBED WITH MARKER DNA

Figure 4: Dot blot hybridization analysis of DNA from Privet Hawkmoth larvae infected with the marked AcMNPV. Individual larvae were challenged with 10^4 - 10^6 polyhedra and allowed to die or to proceed to the normal pupation. DNA was extracted, denatured and applied in duplicate to nitrocellulose filters. This filter was incubated with radiolabelled oligonucleotide, washed and exposed to X-ray film. The developed autoradiogram shows the presence of the marked virus as a dark spot. Controls include insects fed the virus and harvested 1 day later, and uninfected insects.

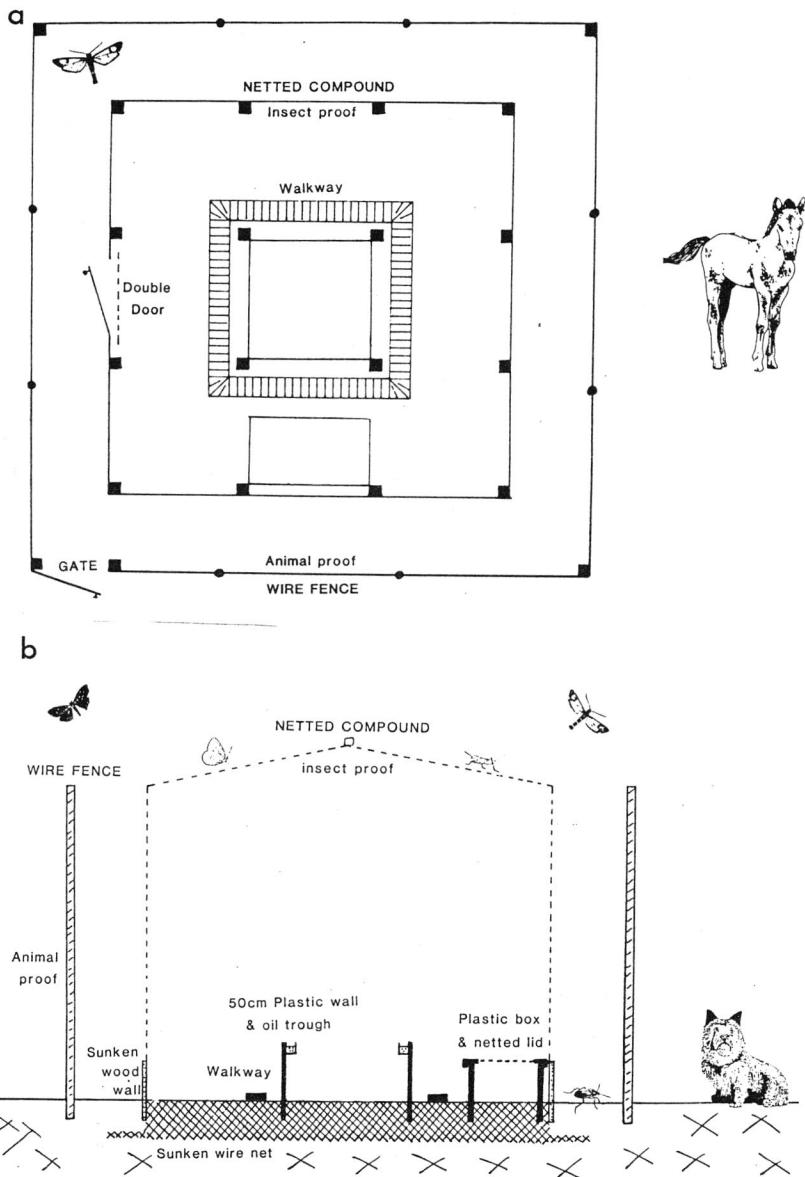


Figure 5: Field site used for release of marked AdMNPV. (a). Plan of the facility showing outer, animal-proof wire fence and inner, insect-proof netted compound. Access to the inner compound was via a double door. The central area contained the plot used for the release and was bounded by a plastic wall with an oil trough to prevent escape of larvae. (b). Elevation of the same facility.

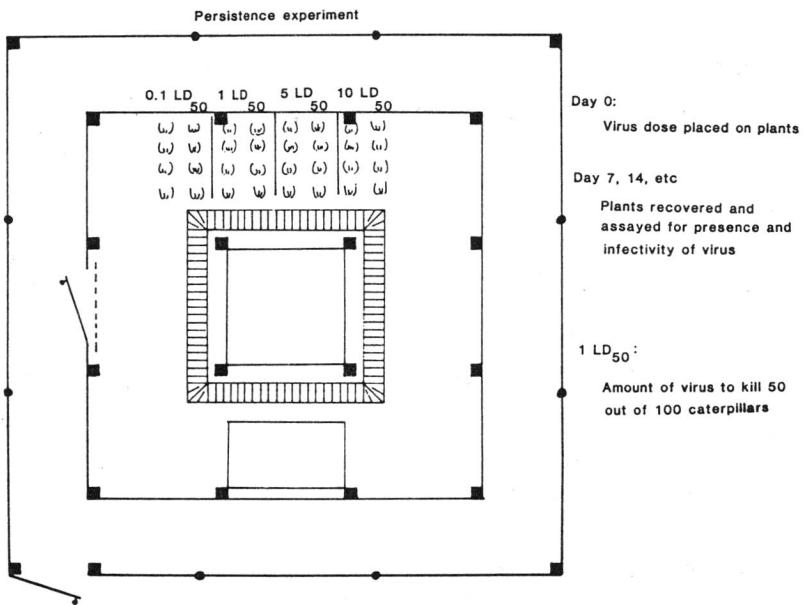


Figure 6: Persistence of marked virus on cabbage leaves. In the area of the field site indicated cabbage plants were grown and treated with increasing concentrations of marked virus. Similar size portions of leaves were recovered from each set of cabbages at weekly intervals and fed to *T. ni* larvae in the laboratory to estimate the loss of infectious virus.

Das *Autographa californica*-Kernpolyedervirus als eukaryantisches Vektorsystem

W. Doerfler

1. DAS INSEKTEN-BACULOVIRUS AUTOGRAPHA CALIFORNICA- KERNPOLYEDERVIRUS

Seit Ende der siebziger Jahre hat eine zunehmende Anzahl von Laboratorien das Autographa californica-Kernpolyedervirus (AcNPV = A.c. Nuclear Polyhedrosis Virus) als molekularbiologisches Modellsystem studiert. Eine allgemein biologische Motivation für diese Wahl lag in der Möglichkeit, dieses Virus zur Bekämpfung von Lepidopteren-Schädlingen in der Natur einsetzen zu können. Ein weiterer wesentlicher Aspekt, der anwendungsbezogen zu einer sehr beachtlichen Ausweitung weltweiter Forschungsaktivitäten am AcNPV geführt hat, war die Entwicklung des AcNPV-Systems zu einem sehr effizienten Expressionsvektor für eukaryontische Gene (Smith et al., 1983). Die wesentlichen Vorteile dieses Vektorsystems bestehen in folgenden Eigenschaften: 1. in der Stärke des viralen Polyhedrinpromotors, der den meisten Vektorkonstrukten zugrunde liegt. Damit können beachtliche Mengen des neuen Proteins synthetisiert werden. 2. in der Fähigkeit von Spodoptera frugiperda-Insektenzellen, an eukaryontischen Proteinen die posttranslationalen Modifikationen vorzunehmen, die notwendig sind, um, jedenfalls in vielen Fällen, biologisch aktive Produkte entstehen zu lassen. 3. in der hohen biologischen Sicherheit dieses Virus-Wirtssystems (Tjia et al., 1983). Seit der Entwicklung dieses Vektorsystems sind weit mehr als 100 eukaryontische Proteine in Insektenzellen synthetisiert worden.

2. ARBEITEN AM AcNPV IM KÖLNER LABORATORIUM

In meinem Laboratorium haben wir in den Jahren 1976/1977 mit Arbeiten am AcNPV begonnen und damit die Tradition von Professor Bergold, früher in Tübingen, zu Arbeiten über Baculoviren in Deutschland wieder aufgenommen.

Unsere Arbeit wurde ursprünglich vom Bundesministerium für Forschung und Technologie, später von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Wir haben von Anfang an versucht, sowohl Projekte der Grundlagenforschung als auch auf Sicherheitsaspekte gerichtete Arbeiten durchzuführen. Unsere Hauptbeiträge zur Kenntnis der Molekularbiologie dieses Virussystems waren die folgenden:

(I) Untersuchungen zur DNA des AcNPV und deren Replikation in Insektenzellen (Tjia et al., 1979). (II) Kinetik der Synthese neuer (viral-kodierter) Proteine in AcNPV-infizierten Insektenzellen (Carstens et al., 1979). (III) Transfektion von Insektenzellen mit AcNPV-DNA (Carstens et al., 1980). (IV) Nachweis, daß AcNPV-DNA in Säugerzellen nicht repliziert oder transkribiert wird und in Massenkulturen in persistierender Form nicht nachgewiesen werden kann (Tjia et al., 1983). (V) AcNPV-RNA wird in Insektenzellen nur in Ausnahmefällen gespleißt (Lübbert and Doerfler, 1984a, Chisholm and Henner, 1988). (VI) In mehreren, vielleicht in fast allen Bereichen des AcNPV-Genoms werden multiple, überlappende Größenklassen viraler RNA mit gemeinsamen 3'- oder 5'- Enden transkribiert ("nested sets") (Lübbert and Doerfler, 1984b). (VII) Die funktionelle Bedeutung dieses interessanten Transkriptionsmodus könnte darin bestehen, daß damit das sequentielle Ablesen hintereinander angeordneter offener Leseraster auf dem AcNPV-Genom ermöglicht wird. Diese Hypothese haben wir zumindest für den Bereich zwischen 81.2 und 85.0 Karteneinheiten auf dem AcNPV-Genom wahrscheinlich gemacht (Oelling et al., 1987; Korrektur der Nukleotid-Sequenz und der Größe der kodierten Polypeptide, Oelling, et al., 1988, 1989). (VIII) Zur Zeit beschäftigen wir uns mit der Frage, ob die in dem Bereich 81.2 bis 85.0 Karteneinheiten auf dem AcNPV-Genom theoretisch kodierten Proteine tatsächlich in infizierten Zellen synthetisiert werden (Happ and Doerfler, in Vorbereitung). Insbesondere interessiert uns ein ARG-SER-reiches Protein, das im dritten offenen Leserahmen (ORF3) kodiert ist (Oelling et al., 1987). (IX) Wir haben zeigen können, daß der Promotor des p10-Gens von AcNPV nach der In-vitro-Methylierung von 5'-CCGG-3' Sequenzen auch in Insektenzellen inaktiviert wird (Knebel et al., 1985). (X) Der gleiche p10-Gen-Promotor ist in Säugerzellen inaktiv, kann aber durch Infektion von Säugerzellen mit Adenoviren aktiviert werden (Knebel and Doerfler, 1987).

3. EXPRESSION EUKARYONTISCHER GENE IM AcNPV SPODOOPTERA FRUGIPERDA-INSEKTENZELLSYSTEM

Mit Unterstützung durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie (Schwerpunkt "Produkte aus tierischen und menschlichen Zellen" 1983 - 1988) haben wir in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen drei verschiedene eukaryontische Gene, ein Virusgen, ein Maisgen und ein sehr interessantes Onkogen, in Insektenzellen exprimiert.

3.1 Haemagglutinin des Virus der klassischen Geflügelpest (Influenzavirus)

Eine cDNA-Sequenz des Influenza-(Geflügelpest)-Virus-Haemagglutinin wurde in eine BamHI-Schnittstelle des pAc373 Polyhedrin-Vektors inseriert. Spodoptera frugiperda-Zellen wurden mit diesem Konstrukt, pAc-HA651, und authentischer AcNPV-DNA kcotransfiziert. Rekombinantes Virus wurde durch Adsorption transfizierter Zellen an Erythrozyten selektiviert und anschließend wurden die Rekombinannten durch Einzelplaqueisolierung auf Spodoptera frugiperda-Zellen gereinigt. Durch Spaltung mit Restikationsenzymen und Southern Blot Hybridisierungsanalysen, bei denen Haemagglutinin-cDNA als Sonde benutzt wurde, haben wir die Insertionsstelle des Haemagglutinins im AcNPV-Genom bestimmt. Das Influenza-Haemagglutinin befindet sich im Polyhedrinen der AcNPV-DNA. Immunfluoreszenz-Markierung, Immunpräzipitation und Immunblot-Analysen mit Hilfe verschiedener Antiseren zeigten, daß Spodoptera frugiperda-Zellen nach Infektion mit rekombinantem Virus immun reaktives Haemagglutinin produzierten. Das Haemagglutinin wurde an der Zelloberfläche exprimiert und hatte haemolytische Wirkung, die durch posttranskriptionale proteolytische Spaltung aktiviert wurde. Wenn Hühner mit Spodoptera frugiperda-Zellen, die Influenza-Haemagglutinin exprimierten, immunisiert wurden, entwickelten sie Haemagglutinin-unterdrückende und -neutralisierende Antikörper und waren gegen Infektion mit Geflügelpest-Virus geschützt. Diese Beobachtungen zeigten, daß das Haemagglutinin in Insektenzellen in ähnlicher Form gebildet wurde, wie es mit Geflügelpest-Virus infizierten Vertebratenzellen und daß dieses Haemagglutinin biologisch voll aktiv war (Kuroda et al., 1986; 1989b).

In neueren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß das rekombinante AcNPV auch nach Infektion von Insektenlarven (Heliothis virescens) Haemagglutinin exprimiert und zwar in den verschiedensten Organsystemen der Raupen (Kuroda et al., 1989a).

3.2 Activator Gen von Zea mays L.

Das im Activator (Ac) Element von Zea mays L. kodierte Polypeptid wurde in Spodoptera frugiperda Insektenzellen durch Plasmide exprimiert, die den starken Polyhedrin-Promotor des AcNPV trugen. Rekombinante AcNPVs mit der Ac-cDNA integriert und unter der Kontrolle des viralen Polyhedrin-Promotors wurden isoliert und ihre Genome wurden teilweise charakterisiert. Nach Infektion der Spodoptera frugiperda-Zellen mit dem rekombinanten AcNPV wurden für das Mais-Ac-Element spezifische mRNAs wie auch ein neu synthetisiertes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 116 kDa in Extraktten der infizierten Zellen nachgewiesen. Dieses Polypeptid ist in Extraktten mit Wildtyp infizierter Zellen, die das Polyhedrin-Polypeptid exprimieren, nicht vorhanden. Die Ac-spezifischen Polypeptide können durch Antisera, die gegen E.coli-synthetisierte, die Ac-Sequenz enthaltende Fusionsproteine gerichtet sind, sowohl

durch Immunpräzipitation wie auch durch "Western blotting" nachgewiesen werden. Das Ac-spezifische Protein ist ein Kern-Phosphoprotein und umfaßt ca. 1 bis 2% des neu synthetisierten Proteins in den Insektenzellen (Hauser et al., 1988; Starlinger et al., 1989).

3.3 Produkt des Onkogens jun

Peter Vogts Gruppe an der University of Southern California in Los Angeles hat aus Avian Sarcoma Virus 17 (ASV 17) das Onkogen jun isoliert und eingehend charakterisiert (Maki et al., 1987). Dieses Onkogen ist insbesondere deshalb hochinteressant, weil es extensive Sequenzhomologien zu dem GCN 4-Gen von Hefe und zum Gen für den transkriptionellen Aktivator Apl bei Säugetierzellen aufweist. In Zusammenarbeit mit Peter Vogts (Los Angeles) und Klaus Bisters Gruppe (Köln) wurde das jun Onkogen in AdNPV rekombiniert. Es gibt erste Hinweise dafür, daß das Gen in Insektenzellen exprimiert wurde (Arbeit von Jian Li, Doktorand in meinem Laboratorium).

Die hier skizzierten Arbeiten, insbesondere die unter 3. beschriebenen Ergebnisse, wurden durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie, Bonn - Bad Godesberg (PBE 03 8498 2, PBE 03 1899 1B) gefördert.

4. LITERATUR

- Carstens, E.B., Tjia, S.T., and Doerfler, W.: Infection of Spodoptera frugiperda cells with Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. I. Synthesis of intracellular proteins after virus infection. Virology 99 (1979), 386 - 398
- Carstens, E.B., Tjia, S.T., and Doerfler, W.: Infectious DNA from Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. Virology 101 (1989), 311 - 314
- Chisholm, G.E., and Henner, D.J.: Multiple early transcripts and splicing of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. J. Virol. 62 (1988), 3193 - 3200
- Hauser, C., Fusswinkel, H., Li, J., Oellig, C., Kunze, R., Müller-Neumann, M., Heinlein, M., Starlinger, P., and Doerfler, W.: Overproduction of the protein encoded by maize transposable element Ac in insect cells by a baculovirus vector. Mol. Gen. Genet. 214 (1988), 373 - 378
- Knebel, D., Lübbert, H., and Doerfler, W.: The promoter of the late p10 gene in the insect nuclear polyhedrosis virus Autographa californica: activation by viral gene products and sensitivity to DNA methylation. EMBO J. 4 (1985), 1301 - 1306

Knebel, D., and Doerfler, W.: Activation of an insect baculovirus promoter in mammalian cells by adenovirus function. *Virus Res.* 8 (1987), 317 - 326

Kuroda, K., Hauser, C., Rott, R., Klenk, H.-D., and Doerfler, W.: Expression of the influenza virus haemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector. *EMBO J.* 5 (1986), 1359 - 1365

Kuroda, K., Gröner, A., Frese, K., Hauser C., Rott, R., Doerfler, W., and Klenk, H.-D.: Expression of the influenza virus haemagglutinin in insect larvae by a baculovirus vector. *J. Virol.* 63 (1989a)

Kuroda, K., Hauser, C., Rott, R., Doerfler, W., and Klenk, H.-D.: Processing of the haemagglutinin of influenza virus expressed in insect cells by a baculovirus vector. In: *Invertebrate Cell Systems in Applications*. J. Mitsuhashi, ed., CRC Press, Boca Raton (1989b) in press

Lübbert, H., and Doerfler, W.: Mapping of early and late transcripts encoded by the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus genome: Is viral RNA spliced? *J. Virol.* 50 (1984a), 497 - 506

Lübbert, H., and Doerfler, W.: Transcription of overlapping sets of RNAs from the genome of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: A novel method for mapping RNAs. *J. Virol.* 52 (1984b), 255 - 265

Oellig, C., Happ, B., Müller, T., and Doerfler, W.: Overlapping sets of viral RNAs reflect array of polypeptides in the EcoRI-J and -N fragments (map positions 81.2 to 85.0) of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus genome. *J. Virol.* 61 (1987), 3048 - 3057

Erratum to this paper (1988) *J. Virol.*, in press

Oellig, C., Happ, B., Müller, T., and Doerfler, W.: On the expression of the AdNPV genome in insect cells. In: *Invertebrate Cell Systems in Applications*. J. Mitsuhashi, ed., CRC Press, Boca Raton, (1989) in press

Maki, Y., Bos, T.J., Davis, C., Starbuck, M., and Vogt, P.K.: Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 2848 - 2852

Smith, G.E., Summers, M.D., and Fraser, M.J.: Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3 (1983), 2156 - 2165

Starlinger, P., Coupland, G., Fußwinkel, H., Heinlein, M., Kunze, R., Laufs, J., Li, M.-G., Stochaj, U., Baker, B., Schell, J., Both, C., Li, J., Oelliq, C., Doerfler, W., and Schwartz, D.: Studies on transposable element Ac in Zea mays. In: UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. The Molecular Basis of Plant Development. R., Goldberg, Ed., Alan R. Liss, New York, (1989) in press

Tjia, S.T., Carstens, E.B., and Doerfler, W.: Infection of Spodoptera frugiperda cells with Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. II. The viral DNA and the kinetics of its replication. Virology 99 (1979), 399 - 409

Tjia, S.T., Meyer zu Altenschildesche, G., and Doerfler, W.: Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells. Virology 125 (1983), 107 - 117

Diskussion IV

Huber: Vielen Dank, Herr Doerfler, für den hochinteressanten Vortrag. Mich fasziniert immer ganz besonders an diesen Expressionsvektoren, daß sie selbst in Raupen funktionieren, nicht nur in Zellkultursystemen. Daß man heute in der Lage ist, z.B. menschliches Interferon in Seidenraupen zu produzieren, ist für mich faszinierend. Wir sollten jetzt zur Diskussion übergehen und ich schlage vor, daß wir zuerst den Vortrag von Herrn Prof. Doepler diskutieren, der Ihnen noch ganz frisch in Erinnerung ist.

Lopez Pila: Herrn Prof. Doerfler, was mich überrascht hat bei dieser Arbeit über Infektionen von Säugetierkulturen mit Baculoviren ist die Tatsache, daß Sie in der Lage waren, Baculoviren-DNA in den Zellkernen nachzuweisen. Hat jemand oder haben Sie selbst so etwas im Tierversuch beobachtet? Wenn man z.B. Fische oder Kaninchen mit hohen Dosen Baculoviren infiziert bzw. die Tiere exponiert, wäre es denkbar, daß man auch in den Zellen dieser Wirte Baculoviren-DNA findet. Denkbar wäre es auch, daß die "neuen" DNA-Sequenzen eines gentechnisch veränderten Baculovirus häufiger zu Rekombinationsereignissen im Kern der aufnehmenden Zelle Anlaß geben. In anderen Worten, daß die zu völlig anderen Zwecken in das Virus eingeführten DNA-Sequenzen als Nebeneffekt zu einer erhöhten Rekombinations- oder Integrationsrate in einem Nichtzielorganismus führen.

Doerfler: Die Frage besteht aus zwei Teilen. Einmal wird nach der Aufnahme von Baculoviren-DNA in Säugetierzellen gefragt und zweitens nach den Chancen, daß veränderte virale Genome zu anderen Rekombinationseignissen führen könnten als es normalerweise zu erwarten wäre. Zuerst möchte ich bemerken, daß wir zu diesen Arbeiten teilweise durch die Untersuchungen von Dr. Granados gebracht wurden. Er hat elektronenmikroskopisch gezeigt, daß bei menschlichen Zellen, die zu Baculoviren exponiert waren, Viruspartikel im Zellzytoplasma nachzuweisen waren. Wenn ich diese Bilder nicht gesehen hätte, hätte ich es als ziemlich aussichtslos angesehen, überhaupt im Kern nach viraler DNA zu suchen. Aber in der Tat: Wir waren überrascht, daß virale DNA in den Kern gelangte. Nun weiterhin zu Ihrer Frage: Wir haben überhaupt keine Tierexperimente durchgeführt, ich weiß aber, daß es in verschiedenen Ländern (USA, Kanada) intensive Sicherheitsstudien gegeben hat; man hat große Mengen Baculoviren an Säugetiere verfüttert. Ich erinnere mich nicht aus Studien dieser Zeit, daß jemand die Art von Untersuchungen gemacht hätte, die Sie gerade erfragen. Inwieweit rekombinante Virus-DNA sich in Säugerzellen oder in ganzen Organismen anders verhält, weiß ich nicht. Man müßte es testen und Herr Huber hat da vielleicht etwas zu sagen.

Huber: Ich glaube, daß das, was wir gehört haben, vielleicht gar nicht so überraschend ist. Wir hörten gestern, daß bei Fischen, die phagenexponiert waren, nachher in verschiedenen Geweben Phagen gefunden wurden, und es gibt ähnliche Untersuchungen mit Mäusen, die massive Dosen von Baculoviren bekamen.

Lopez Pila: Das Überraschende ist doch, daß diese Viren offenbar in der Lage sind, den Darm zu passieren, dann ins Blut oder in die Lymphe zu gelangen und von dort aus in die Organe.

Huber: Vielleicht muß man sagen, daß die Aufnahme von Baculoviren in die Insektenzelle nicht auf der Anwesenheit von spezifischen Rezeptoren beruht, wie es sonst üblich ist. Es sieht dagegen so aus, daß diese Viren in eine Vielzahl von Zellen gelangen können und daß die DNA in den Kern gelangt, wo es dann zu keiner weiteren Entwicklung kommt. Das Verblüffende an den Baculoviren ist, daß ihre Aufnahme offensichtlich so unspezifisch und doch ihr Wirtsbereich so selektiv ist.

Doerfler: Die Feststellung, daß fremde DNA völlig heterologer Systeme bis in den Kern gelangt, wenn das Virus in die Zelle eingedrungen ist, bedeutet vielleicht nur, daß jeder DNA-Protein-Komplex zum Kern transportiert wird. Wir haben Experimente in ganz anderem Zusammenhang in Köln gemacht, bei denen man alle möglichen DNA's, z.B. auch nur Plasmid-DNA, mit Protamin komplexiert hat und diesen Protamin-DNA-Komplex auf Zellen gegeben hat. Er wird von den Zellen aufgenommen, und die DNA gelangt in ganz kurzer Zeit in den Kern. Wenn also DNA in der Gegend der Zelle ist, dann geht offenbar schon eine große Anzahl von DNA-Protamin-Komplexen nicht nur in die Zellen hinein, sondern bis zum Kern. Wir sind in einem ganz anderen Zusammenhang an dem interessiert, was nach der DNA-Aufnahme in der Zelle passiert. Sie sagen, das sei eine sicherheitstechnische Frage; ich sage: Das ist überhaupt keine sicherheitstechnische Frage, sondern ein tägliches Geschehen. Wir nehmen ja DNA dauernd auf. Wenn ich Fisch gegessen habe, habe ich natürlich auch DNA aufgenommen. Was passiert mit der DNA? Mancher sagt, sie wird im Darm völlig abgebaut. Das mag vielleicht stimmen, aber vielleicht auch nicht. Ich glaube, da liegt ein interessantes Betätigungsfeld, das gar nichts mit Sicherheitsaspekten zu tun hat, sondern mit dem, was die Umwelt, die ganz normale Umwelt, für jeden einzelnen von uns eigentlich bedeutet.

Dr. Klein: Mit einer Frage zur Wirtsspezifität: Wir haben z.B. eine sehr deutliche Unterscheidung der Rezeptivität von Larven und Imagines bei verschiedenen Schadinsekten und Schmetterlingen verschiedener Art. Ist denn untersucht worden, inwieweit Bodeninsekten, Aniliden, Nematoden und Krustacea von diesen Baculoviren und in welcher Weise besiedelt werden und ob es da zu relevanten Effekten kommt? Ich möchte auch die Sicherheitfrage etwas ausdehnen über die unmittelbare Betroffenheit der Menschen hinaus, die am Ende dieser ganzen Kette dann Wasser trinken.

Huber: Die Frage ist sicher berechtigt. Vielleicht ist durch meine Aussage über die Existenz von Baculoviren bei Artropoden der Eindruck entstanden, wir fänden ein bestimmtes Baculovirus bei der Vielzahl von Artropoden; das ist jedenfalls falsch. Die Wirtsspezifität geht also wirklich dahin, daß normalerweise ein bestimmtes Virus höchstens noch ein paar nahe Verwandte - und mit "nah verwandt" meine ich "zum selben Genus gehörend" -, im allgemeinen aber nur Insekten befällt. Das Virus, von dem heute sehr viel gesprochen wurde, ist das Baculovirus von *Autographa California*; das ist das Insektenvirus, mit dem weitesten Wirtsbereich. Selbst dieses Virus befällt nur Insekten innerhalb derselben Insektenordnung, nämlich der Schmetterlinge, und zwar sind bis heute Schmetterlinge aus etwa 12 Schmetterlingsfamilien bekannt, die im Labor mit diesem Virus infiziert werden können. Aber selbst dieses für Baculoviren extrem breitenwirksame Virus befällt nur Schmetterlingsraupen. Bodenorganismen gehören meistens zu ganz anderen Ordnungen, teils zu den Aniliden, teils zu anderen Stämmen (z.B. Regenwürmer). Von daher ist wirklich überhaupt nichts zu befürchten. Bei Krustäßen wurden Baculoviren gefunden, aber völlig andere.

Dr. Klein: Ich möchte die Frage konkretisieren. Ich habe nicht gefragt, ob etwas zu befürchten sei, sondern ob anhand der Bodenorganismen untersucht wurde, was gegebenenfalls dort stattfindet.

Huber: Regenwürmer wurden gezielt untersucht, ebenfalls Wasserorganismen. Man muß klarstellen: Solange nicht ein bestimmtes Tier untersucht wurde, können wir nie mit Sicherheit sagen, dieses Tier sei unempfindlich. Es ist nur höchst unwahrscheinlich aufgrund unseres Wissens über den Wirtsbereich dieser Baculoviren, daß jetzt kein einziger Anilide, aber vielleicht jetzt gerade ein ganz bestimmter Bodenanilide befallen wird. Aber zugegeben: Solange ein bestimmtes Tier nicht wirklich untersucht wurde, können wir keine ganz sichere Aussage machen. Wir haben aber praktisch alle Hinweise darauf, daß diese Tiere nicht empfindlich sind.

Plasmids in the Environment

A. H. Linton

SUMMARY

Bacterial plasmids existed in bacteria before the antibiotic era but their presence was brought into prominence by the use of antibiotics which selected for antibiotic resistant strains. Subsequently, the range of genes carried on plasmids was shown to extend far beyond those coding for antibiotic resistance. Any consideration of plasmids in the environment, therefore, must include all plasmids whether or not they are genetically linked with antibiotic resistance.

Antibiotic resistant bacteria may be found in the environment either by contamination with excreta from man and animals in which the strains were selected, or by their selection within the environment by antibiotics synthesized in situ or reaching the environment in an undegraded form in sewage from man and animals, or from industry. Other agents, also contaminating the environment, exert a selective pressure such as heavy metals in industrial effluents which select for metal resistance.

This paper reviews the incidences and role of plasmids in various habitats including natural waters, soil, pastures, farm wastes, and human sewage from both hospitalised and other populations. Aspects of plasmid ecology, their biological role, and the transmissibility of genetic material between bacteria within the environment are considered.

Two recent studies in Bristol, UK, are reported. The first was a genetic study on *Escherichia coli* isolates from calf slurry. Various DNA probes were used to determine the extent of gene exchange between the various serotypes within the natural environment. The second was a preliminary study to determine the stability of a recombinant plasmid, in a wild strain of *Escherichia coli* of pig origin, after its release into a semi-contained farm situation.

It is now recognised that plasmids are widely distributed in bacterial populations in terrestrial and aquatic environments. Many have been detected by their carriage of genes coding for antibiotic or heavy metal resistance. Others, mainly cryptic in nature, have been demonstrated by plasmid profile studies on isolates from various habitats.

Plasmids were shown to be present in a relatively few bacteria deposited in culture collections prior to the antibiotic era [34]. Subsequently, the increased prevalence of R plasmids in bacteria in most ecosystems were due mainly to the selective pressure imposed by the use of antibiotics [47]. This pressure may have been exerted either in the environment in which the strains were found or elsewhere, the environment subsequently being contaminated by antibiotic resistant bacteria. For selection to have occurred in the environment, either antibiotics were synthesised *in situ* by microorganisms in the indigenous microbiota or the environment was contaminated by antibiotics, as occurs regularly following their use for the treatment of diseases of fish, plants, animals and man, and as 'feed additives' for growth promotion in animals. There is little data available to indicate the *in situ* production of antibiotics by organisms in the environment and Linton and Richmond [52] have argued strongly that even where this occurs it is unlikely to impose a significant selective pressure for antibiotic resistant strains. Jones [38], however, considers that natural resistance in indigenous microorganisms may result from contact with potential antibiotic-producing fungi and actinomycetes in the environment and may explain why antibiotic resistant bacteria are found frequently in situations remote from contamination by humans or animals.

On the other hand, contamination of the environment by considerable quantities of undegraded antibiotics inevitably occurs following their use in fish farming and agriculture, and especially in excreta from animals and man undergoing antibiotic therapy. There is, however, very little quantitative data on the levels of antibiotic contamination or the selective pressure imposed.

By far the greatest use of antibiotics for therapy and prophylaxis is in man and animals and, to a lesser extent, for growth promoting purposes in domestic animals. That these exert a strong selective pressure on the microbiota of the treated animals is beyond question. It is by contamination from these sources that most antibiotic resistant bacteria arise in the environment. Excreta laden with antibiotic resistant bacteria reach the environment in sewage and animal slurry or manure. This in turn contaminates natural waters and agricultural land to become sources of resistant strains for animals and man drinking the water and eating contaminated cultivated foods. Once antibiotic bacteria are introduced into the environment, the genes on plasmids or transposons coding for antibiotic resistance may be transferred to indigenous bac-

teria thereby introducing 'foreign' DNA into the ecosystem. Subsequent transfer may occur between the indigenous organisms with deeper penetration into the ecosystem.

Some plasmids that confer antibiotic resistance also confer resistance to heavy metals [38, 58, 60, 69] although the genes for these may not necessarily be linked and some strains demonstrate metal resistance in the absence of antibiotic resistance [36]. Bacteria, resistant to levels of many heavy metals to which most bacteria are sensitive, have been widely reported [17, 83]. Since Richmond and John [64] demonstrated that resistance to mercury salts in a strain of *Staphylococcus aureus* was coded on a penicillinase plasmid, it has been shown that heavy metal resistance is generally plasmid-mediated in both Gram positive and Gram negative bacteria [16]. Bacteria resistant to heavy metals have been isolated from a number of environments including soil [43, 44, 58], water [35, 36, 61, 69] and hospital effluents [37, 58, 60].

The heavy metal resistance determinant most frequently encountered is that for mercury. It has been found in a wide range of bacteria [80] including *Esch. coli*, *Kleb. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa* and *Staph. aureus* among clinical isolates. Resistance to arsenate, cadmium, lead and mercury have been encountered [16, 80], often quite frequently, probably a consequence of mercury resistance determinants being located on transposable elements [35, 73]. There is evidence that these high frequencies are maintained by selection since it has been reported that with the discontinuation of the use of mercurials as antisepsics in hospitals the proportion of mercury resistant *Escherichia coli* fell [63]. This suggestion was supported by the fact that in the same population the frequency of resistance to antibiotics and to other metals remained the same. Khesin and Karasyova [44] reported mercury resistant bacteria present in soil from a mercury and antimony mine but absent from uncontaminated soil some distance away. Plasmids coding for mercury resistance in these isolates could be transferred to recipient strains of *Esch. coli*. Plasmid-borne resistance to antibiotics and heavy metals have been transferred from environmental isolates to various laboratory and clinical recipients *in vitro* [19, 74]. For example, strains of *Esch. coli*, *Kleb. pneumoniae*, *Enterobacter spp.* and *Salmonella spp.* resistant to heavy metals and antibiotics, isolated from polluted rivers and lakes, municipal waste waters and estuarine waters, effluents from pig and cattle breeding stations, and urine and faeces from humans treated with antibiotics, transferred their resistances to recipient *Esch. coli* *in vitro* [10, 51, 67]. Similarly, Smith [71] showed that the plasmids in antibiotic resistant isolates of *Esch. coli* from rivers polluted with sewage were able to transfer their plasmids *in vitro* to *Salmonella typhi* and *Salm. typhimurium*.

STUDIES ON VARIOUS ENVIRONMENTS

The presence and incidence of plasmids in various ecosystems have been investigated by many workers and a list with references is given in Table 1. Some of these have been reviewed by Stotzky and Babich [74] and a selection will be considered below.

SEWAGE

In most countries the greater proportion of antibiotics are used in the treatment of human patients and by far the most extensive use is concentrated in hospitals. This is reflected in the high incidence of R-plasmid carrying commensal and pathogenic bacteria in hospitalised patients [48, 49]. The number of resistant bacteria in non-hospitalised persons not receiving antibiotics is usually very low. Nevertheless, a number of surveys indicate that over 50% of healthy adults and children excreted resistant strains in detectable numbers; the incidence varied between groups of persons. Linton [54] reported that persons living in rural areas, where they had opportunity for contact with farm animals, carried a higher incidence of resistant strains than urban dwellers. In a broader study [55] using sewer swabs, rather than individual samples, taken from sewers serving housing estates, outflows from hospitals and points where pooled city sewage entered the sewage treatment works in Bristol, UK., it was possible to compare different types of population. As was expected, hospital sewage was shown to contain coliform bacilli with a much higher proportion of antibiotic resistant bacteria and a greater number of R-plasmids coding for multiple resistance than sewage from domestic and other sources. Nevertheless, taking into account the total volume of sewage output from the city of Bristol over the same period of time, less than 5% of all plasmid-bearing organisms originated in hospitals. The non-hospitalised population was shown to be by far the greater reservoir of R-plasmids although much less concentrated than in the hospital situation.

Grabow and Prozesky [21] also demonstrated high incidence of R-plasmid carrying bacteria in sewage in S. Africa and concluded that sewage may be of prime importance in the spread of these bacteria by irrigation of edible crops with sewage contaminated water (see later). In a series of papers, Grabow et al. [20, 22, 23, 24] studied the dynamics of multiple antibiotic resistant coliforms in a series of sewage maturation ponds which functioned in reducing the coliform counts and were used in the tertiary treatment of sewage. They demonstrated that R-plasmid bearing strains persisted longer than sensitive ones and suggested that either resistant strains were more tolerant of the adverse conditions in the maturation ponds or transfer of the R-plasmid had occurred thereby maintaining the pool.

The same authors also compared the dynamics of resistant and sensitive components of bacterial populations in river water into which sewage entered from a treatment plant, with dammed water 10 km downstream. The ratio of plasmid-bearing strains of coliforms to the total numbers present decreased as the water flowed downstream but increased in the dammed water. The difference was related to the turbulence of the river water reducing the chance for conjugation of strains to occur. In contrast, the relative lack of turbulence in the dammed water was conducive to transfer of genetic material. Similar observations have been made on settled sewage, effluent waters after biofiltration, secondary sedimentation, chlorination and sand filtration. Invariably the ratio of resistant to sensitive coliform counts increased under conditions where relatively stagnant conditions pertained but no increase was demonstrated in other processes where rapid flow of water occurred, as over stony surfaces in the biological and sandfilters [3, 74]. Similar observations were made on chlorinated river water in the laboratory and it was concluded that antibiotic resistant members of a bacterial population can increase in treated drinking water. It is generally held [75] that strains bearing R plasmids survive in conventional sewage systems and Smith [77] showed that resistant strains survived equally well as sensitive ones in sea water.

ANIMAL EXCRETA AND SLURRY

As in man, the wide use of antibiotics in animal husbandry has selected for antibiotic resistant bacteria and consequently large numbers of resistant strains are excreted, particularly by farm animals. Ecological studies of *Esch. coli* in farm animals, involving detailed characterization of phenotype, demonstrated a number of apparent paradoxes. For instance, when individual animals, particularly young animals, were investigated intensively, the strains forming the majority *Esch. coli* flora in faeces were found to change continuously with time [30, 31, 32, 33]. In contrast, when specific *Esch. coli* strains were monitored over long periods of time in populations of animals and their environment they persisted and appeared to be relatively stable both phenotypically and genetically [1, 33, 51]. With the multiplicity of bacteria, plasmids were very common and multiple plasmid carriage was frequent [51]. It would appear that most of these plasmids were able to transfer conjugally, either because they were self-transmissible or because they were mobilized on one or other of the plasmids harboured by the bacterium (Heard & Bennett, unpublished).

Considerable interest has been shown on the survival of pathogenic organisms such as salmonellae in slurry (a mixture of faeces, urine and water from intensive systems of management where straw bedding is not used), and their potential danger as a source of infection for farm stock and, indirectly in food and water, for man [50]. There is less published information on the survival

of microorganisms containing R-plasmid outside of the animal in slurry, and after spreading slurry on farm land [51]. Accordingly, studies were carried out on the survival of naturally occurring *Salm. typhimurium* and multi-antibiotic resistant *Esch. coli* in slurry [21], and on pasture treated with slurry. Slurry from a veal unit was sampled over a period of 7 weeks. Viable *Salm. typhimurium* persisted in small numbers throughout the period of study. The number of viable coliforms in the slurry fell by several logarithms during the early days of the study but, thereafter, remained relatively stable suggesting that either the majority retained their viability at the low temperature at which the slurry was held or the population was maintained by multiplication at a rate sufficient to replace those bacteria that died. Analysis of the dominant *Esch. coli* flora, by O-serogrouping and biotyping, indicated that the population was extremely complex and certain strains persisted throughout the 7 weeks of the study. At least 30 O-serogroups were present and a wide range of different antibiotic resistance patterns were distributed among the various serogroups. A high incidence of chloramphenicol resistance (55%) was demonstrated across a wide range of the serogroups present and the R-determinant for chloramphenicol was carried on an Ind-H2 plasmid similar to that carried by the multi-resistant *Salm. typhimurium* also found in the calves and their slurry. There were strong indications that transfer of the plasmid has occurred from the salmonella to the coliform population and between different serogroups of *Esch. coli* in the slurry [29, 53].

Three years later a further study (Bennett & Heard, unpublished) was carried out on 96 isolates of *Esch. coli* from the same slurry tank. All isolates were multi-resistant to a range of antibiotics including ampicillin, tetracycline, streptomycin, chloramphenicol and kanamycin, indicating substantial gene exchange. They belonged to the same range of O-serogroups originally present and each isolate contained more than one plasmid, some as many as 8 or 9.

It might be expected that plasmid sequences would be fairly widely disseminated among the bacteria in a particular environment and this was demonstrated. DNA-DNA hybridization studies, using DNA probes from Tn3, Tn7 and Tn21, demonstrated that many of the plasmids detected in the 96 isolates carried sequences homologous to known drug resistance transposons. Tn3 sequences were, by far, the most common being detected in many of the isolates (in approximately 50% of the plasmids detected).

The plasmid profiles were also probed with a set of five plasmids obtained by conjugation from one of the isolates. Molecular studies showed three of these to be related. Significant levels of homology to one or more of these plasmids were observed in approximately 25% of the isolates. However, the plasmids that displayed homology to the particular probe were rarely of the same size as the probe plasmid (Fig. 1 u. 2). The data indicated that considerable interchange of extrachromosomal DNA had taken place between the bacteria in the slurry tank from which the sample was obtained. The data also

indicated that this genetic flux was not simply restricted to the flow of plasmids from one bacterium to another. Rather the DNA itself would appear to be in a dynamic state, constantly undergoing rearrangement of markers, and this was reflected in the large variety of plasmid sizes detected in the 96 isolates examined but which nevertheless displayed homology. The detection of well described transposon sequences (Tn3, Tn7, Tn21) indicated how this genetic flux occurred on at least one level. This limited date indicated a very dynamic situation including gene flow between plasmids and plasmid flow between bacteria.

A wider appraisal of the distribution of antibiotic resistance among the microbiota of the slurry and the animals' environment demonstrated that many Enterobacteriaceae, and other non-lactose fermenting bacteria, were also multi-resistant [51]. These studies were extended by Hawkey et al. [28]. They characterized the plasmid carriage of Proteaceae isolated from calf bedding soiled with faeces and urine, and compared them with human isolates. A considerable diversity of species and biotypes of Proteaceae were found associated with calves and their environment, many of which resembled human isolates from nosocomial infections. Fifteen percent of animal associated isolates carried one or more plasmids ranging in size from 6 to 50 kilobases. Strains of the same serotype isolated from the same sample were found to carry different plasmid patterns.

Preliminary studies were carried out to determine the survival of antibiotic resistant bacteria on ungrazed pasture spread with either calf or pig slurry. Samples of upper grass without soil and lower grass and roots with soil, were subjected to bacteriological counts. Both studies showed a steady fall in bacterial numbers over six weeks, from above 10^6 to less than 10^1 [51]. These findings were similar to those described by Taylor and Burrows [77] who studied the survival of salmonellae on slurry-treated pasture.

Another source of contamination of pastures and other grasslands is by the droppings of birds, especially sea-gulls. After scavenging raw human sewage, seagulls frequently roost on nearby fields and parks to rest, preen and defaecate [81]. The fields, if grazed by livestock, may be a source of antibiotic resistant bacteria for the animals. Fenlon [14] demonstrated that the *Salmonella* serotypes carried by gulls were the same as in the related human population and that the resultant sewage was most probably the source of infection for the gulls. Many of the plasmids carried by the salmonellae were transmissible. *Esch. coli*, from both raw sewage and gulls which scavenged it, often demonstrated similar resistance patterns and a significant proportion carried transmissible plasmids.

CULTIVATED FOODS

Contamination by enteric organisms of cultivated foods is not limited to animal pastures. While most bacteria associated with agricultural products would be expected to be non-faecal in origin, Levy [46] has demonstrated that large numbers, associated with fruits and vegetables for human consumption, were both faecal in nature and antibiotic resistant. The likely source was irrigation of agricultural land by inadequately treated human sewage or waste. His unexpected findings are illustrated in Table 2. Many of these organisms carried transmissible R plasmids and this finding could explain why many persons not receiving antibiotics, or on a vegetarian diet [26], may be colonized by large numbers of resistant bacteria.

AQUATIC ENVIRONMENT

Plasmids have been shown frequently to be present in bacterial populations of aquatic habitats. Most investigations of the gene pool in these habitats have concentrated on the incidence of antibiotic resistant bacteria of faecal origin [5, 23, 62] or those carrying heavy metal resistance [4, 10, 36]. Generally, higher numbers of plasmid-bearing bacteria have been isolated from polluted waters [74]. For example, plasmid-carriage has been demonstrated in *Pseudomonas*-like organisms isolated from river water in S. Wales [9], in aerobic heterotrophs from Chesapeake Bay [18], and in faecal coliforms and salmonellae in river waters near urban areas in N. Canada [6, 7, 8]. Plasmid carriage was not necessarily limited to faecal organisms. For instance, a large proportion of non-faecal planktonic marine species of *Vibrio*, isolated from a polluted area near an operational oil field in the Gulf of Mexico, were also shown to carry plasmids which were absent in isolates from an unpolluted control site 8 Km distant [27].

In many freshwater systems, faecal bacteria are of little numerical significance in spite of the fact that they are discharged into almost all inland waters [39, 40]. With the exception of faecal streptococci, the incidence of antibiotic resistance, as determined by methods developed for testing medical isolates, was significantly higher among isolates obtained from the lake waters of Windermere UK., than in those from the sewage effluent. This was particularly true of *Klebsiella* spp., *Esch. coli* and aquatic bacteria not of faecal origin. The incidence of antibiotic resistance within a particular group or genus does not, however, provide full information of the relative size of the gene pool within the natural environment. For instance, the results shown in Table 3 reveal that the approximate lake water populations of different groups of bacteria confirm beyond doubt that the bulk of the antibiotic resistance pool

resides within the non-faecal aquatic bacteria. This is further demonstrated by considering the properties of particular species within the genus *Pseudomonas* (Table 4). It was evident that the highest incidence of resistance resided in the aquatic species rather than those associated with animals and man. If the environmental pool of plasmids is to be measured with any degree of thoroughness, therefore, bacteria other than those of faecal origin must be considered.

Glassman and McNichol [18] noted that the plasmids carried by bacteria from less polluted sites were predominantly small (ca 3 Mdal) whereas those from polluted sites were greater than 30 Mdal and large enough to contain genes capable of conjugal transfer. Kobori et al. [45] found that 35% psychrophilic and psychrotrophic bacteria isolated from sea ice, sea water, sediments and benthic or ice associated-animals in the Antarctica contained at least one plasmid, the majority of which had a mass of 10 Mdal. Simon et al. [68] demonstrated that 43% of bioluminescent marine bacteria contained plasmids ranging in size from 5 - 120 Mdal.

Jobings et al. [36] observed a high incidence of mercury resistance strains in the polluted waters of the R. Mersey, UK., and studied the transferrability of the plasmid-borne mercury resistance determinant. Unlike the findings of other workers [37, 58, 69] these isolates showed a lack of antibiotic resistance among the mercury-resistant strains indicating an absence of any joint selection in this particular aquatic environment, but some strains showed linked-resistance to other metals including cadmium, zinc and nickel. A high proportion of the isolates contained plasmids, the majority of them were cryptic for the range of functions tested and 25% of the mercury resistant strains were able to transfer resistance to recipient *Esch. coli*. These strains exhibited a range of plasmid profile, both in numbers and size, and furnished strong evidence of widespread transfer of their plasmids through the normal aquatic population under natural environmental conditions. Three distinct groups of plasmids encoding for mercury resistance were identified and partial DNA homology, especially between two of them, indicated dynamic exchange of genetic components, as has been described above in slurry.

EVIDENCE FOR TRANSMISSION OF GENETIC MATERIAL IN THE ENVIRONMENT

Information on the transfer of genetic material between microorganisms in their natural habitats is beginning to appear in the literature [19]. For instance, Fontaine & Hoadley [15] were able to demonstrate transfer of antibiotic resistance genes in hospital sewage between R-plasmid carrying coliform bacilli and *Salm. choleraesuis* at both 23°C and 30°C. Sagik et al. [65] investigated plasmid transfer in sewage sludge under experimental conditions and noted that

the numbers of indigenous bacteria which became resistant to various antibiotics, coded by genes on plasmids carried by donor bacteria introduced into the system, increased almost five-fold within 24 hours. The investigators concluded that "such observations are suggestive of plasmid transfer". The ability of resistant strains of *Salm. enteritidis*, *Prot. mirabilis* and *Esch. coli*, isolated from clinical specimens, to transfer their resistance to sensitive *Esch. coli* and *Shigella sonnei* in a wastewater treatment plant, was studied by Mach & Grimes [56]. Transfer was demonstrated although the rate of transfer was lower than in vitro studies; it was thought that this was due to the lower temperature of the waste water (10.6°C as compared to 20°C). A similar temperature effect was noted by Bale et al. [4] (Fig. 3 u. 4). The frequency of transfer was greater in the secondary clarifier, compared with the primary one, probably due to differences in pH and BOD. Transfer of plasmids from natural aquatic isolates to laboratory strains of recipient *Esch. coli* in sterile pond water was demonstrated but at low frequency probably due to poor nutritional status and the low temperature at which the water was held. Stotzky and Babich [74] also noted that survival of transconjugants arising in soil was generally better than that of donor and recipient bacteria, especially in soils to which the clay mineral, montmorillonite was added. It was believed that montmorillonate enhanced the growth of the donor and recipient strains and, thereby, increased the number of contacts between them, as well as increasing the pH of the soil to levels more conducive to conjugation in laboratory strains. Stotzky and Babich [74], however, concluded, "It must be stressed that reports of the presence of R-plasmids in bacteria isolated from natural environments and of the transfer of R-plasmids from such environmental isolates to laboratory strains are only suggestive of the occurrence of genetic transfer in situ. Relatively few studies on the transfer of plasmids or chromosomal DNA have been conducted in samples of aquatic and terrestrial environments, and most of these studies have focused on the possible transfer in sewage plant facilities".

Evidence for transfer occurring in the calf's environment was presented by Timoney and Linton [78]. An IndH2 plasmid (coding for resistance to chloramphenicol, sulphonamides, streptomycin and tetracycline) was present in *Salm. typhimurium* phage typed DT 193 causing endemic infection in intensively housed calves and was also demonstrated in unusually high numbers of *Esch. coli*, of a range of O-serogroups, isolated at the same time from the calves [53]. It was assumed that transfer of the plasmid had occurred between the *salmonellae* and the *Esch. coli* but, since transfer of IndH2 plasmids is considerably reduced at temperatures above 34°C [70], it was assumed to have occurred outside the animal's body. This was shown to be the case. Calves given donor and recipient strains of *Esch. coli* did not excrete transconjugants as long as the calves were muzzled. However, once the muzzles were removed, allowing the calves to lick their environment, they became rapidly colonized by transconjugants. In vitro experiments demonstrated that plasmid transfer occurred

in voided faeces held at 30°C or below at a frequency of ca 2×10^{-3} . The implication was that transfer between salmonellae and a range of Esch. coli O-serogroups took place in voided faeces (particularly while it was kept warm by animals lying down on soiled bedding) and the transconjugants which formed were subsequently ingested by the calves.

STUDIES ON THE FATE OF A GENETICALLY ENGINEERED MICROORGANISM AFTER RELEASE (BENNETT & BRITO, unpublished data)

There is considerable interest on what happens to genetically engineered microorganisms (GEM) once they have been released into the environment. Some preliminary observations made at Bristol are reported here. Currently, studies are in progress to investigate the fate of one particular GEM after oral administration to piglets. The GEM was a porcine strain of Esch. coli (serogroup 045), into which was introduced a recombinant plasmid, pUB3744. The host strain had not otherwise been manipulated, except that spontaneous mutants resistant to naladixic acid (Nal-R) and rifampicin (Rif-R) were used rather than the original natural isolate from a pig. The phenotypes Nal-R and Rif-R facilitated easy and reliable identification. pUB3744 is a hybrid plasmid constructed by fusing (*in vitro*) plasmid pFM205 (pBR322 with cloned K88 genes [59]) and pUB1844 (pACYC184 with cloned *eltB* gene [66]). The hybrid plasmid also conferred resistance to ampicillin (Ap) and chloramphenicol (Cm), hence the resistance profile NalApCm and RifApCm were quite distinctive. Cells carrying pUB3744 expressed the K88 genes and the *eltB* gene as well as the two resistance genes.

The experiments with the 045 strain carrying pUB3744 were primarily designed to determine if the orally administered live bacterium would invoke an immunological response in the host animal which would be sufficiently strong to give protection against infection by pathogenic strains carrying the K88 adhesion genes and a fully functional LT-toxin system. In addition, the animal's excreta were monitored for survival of the administered strain, and the plasmid content of any organisms recovered were also determined.

The natural pig isolate, Esch. coli serogroup 045, carried one small plasmid and five large plasmids, all uncharacterised. To this array of plasmids was added pUB3744 by transformation. The purpose of using a natural isolate rather than an Esch. coli K12 derivative was with the expectation that this strain would survive in the intestine for sufficient time to evoke an immune response. In the event, the GEM survived passage through the gastro-intestinal tract of the pig, but there was little evidence that it multiplied significantly during passage. In contrast, there was strong evidence that pUB3744 underwent alteration during passage through the gut in that the plasmid profiles of a number of the strains recovered from the faeces of dosed pigs were different from

the original. Where, prior to passage, pUB3744 was clearly visible as a plasmid of intermediate size (approx. 10 kb) in some isolates this continued to be present but, in addition, other bands with high degrees of DNA homology were also present. In other isolates the parent band was missing but other bands with high degrees of homology were present. These additional bands were sometimes of larger molecular weight suggesting accretion of DNA while in other they were smaller suggesting a loss of DNA. None of the other plasmids carried by the bacterium were apparently altered, but the possibility remains that different resident plasmids were involved in the various rearrangements observed. The isolates from the pigs represent a rich source of material with which to probe the interactive behaviour of a genetically manipulated DNA molecule, with other DNA molecules, in an organism subjected to environmental, as distinct from laboratory imposed, selective pressures and further work is proceeding. Similar changes were noted, but in differing proportions, in a culture of the parent strain held for over 12 months on a Dorset's egg slope at room temperature (Figure 6).

GENERAL CONCLUSIONS

This broad survey has highlighted a number of features. It is clearly established that many bacterial species in a variety of natural habitats carry plasmids coding for a range of known and unknown functions. Many have been shown to be transferrable to laboratory recipient strains and there is increasing evidence that plasmids are transferred between indigenous bacteria within the natural microbiota. A number of investigations on DNA homology between plasmids, and between bacteria within a number of environments, have clearly indicated that DNA may be found in a dynamic state, constantly undergoing rearrangement of genes between plasmids, as well as plasmid flow between bacteria.

REFERENCES

1. Achtman, M., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A., Sutton, A., and Silver, R.P.: Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates: *Infect. Immun.* 39 (1983), 315 - 335
2. Armstrong, J.L., Shigeno, D.S., Calomiris, J.J., and Seidler, R.J.: Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (1981), 277 - 283

3. Bale, M.J., Fry, J.C., and Day, M.J.: Plasmid transfer between strains of *Pseudomonas aeruginosa* on membrane filters attached to river stones. *J. gen. Microbiol.* 133 (1987), 3099 - 3107
4. Bale, M.J., Fry, J.C., and Day, M.J.: Transfer and occurrence of large mercury resistance plasmids in river epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988), 972 - 978
5. Bayne, S., Blankson, M., and Thirkell, D.: Enumeration and speciation of Group D streptococci from above and below a sewer outfall, their susceptibilities to six antibiotics and a comparison with clinical isolates. *Antonie van Leeuwenhoek* 49 (1983), 299 - 410
6. Bell, J.B., Elliott, G.E., and Smith, D.W.: Influence of sewage treatment and urbanization on selection of multiple resistance in faecal coliform populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (1983), 227 - 232
7. Bell, J.B., Macrae, W.R., and Elliott, G.E.: Incidence of R factors in coliform, faecal coliform and *Salmonella* populations of the Red River in Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 (1980), 486 - 491
8. Bell, J.B., Macrae, W.R., and Elliott, G.E.: R factors in coliform-faecal sewage flora of the prairies and Northwest territories of Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (1981), 204 - 210
9. Burton, N.F., Day, M.J., and Bull, A.T.: Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in a South Wales river. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1982), 1026 - 1029
10. Ceni, G., Morrozi, G., Scazzochio, F., and Morosi, A.: Antibiotic and metal resistance of *Escherichia coli* isolated from different environmental sources. *Zbl. Bakt. Hyg. A.* 3 (1982), 440 - 449
11. Cole, M.A., and Elkan, G.H.: Multiple antibiotic resistance in *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37 (1979), 867 - 870
12. Corliss, T.L., Cohen, P.S., and Cabelli, V.J.: R-plasmid transfer to and from *Escherichia coli* strains isolated from human faecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1981), 959 - 966
13. Feary, T.W., Sturtevant, A.B., and Lankford, J.: *Arch. Environ. Hlth.* 25 (1972), 215 - 220, quoted by Stotzky and Babich, (1986)

14. Fenlon, D.R.: Diet, disease and drug resistance in wild and domesticated birds, p. 243 - 254. In M. Woodbine (ed.), *Antimicrobials and Agriculture*. Butterworth, London (1984)
15. Fontaine, T.D., and Hoadley, A.W.: *Hlth. Lab. Sci.* 13 (1976), 238 - 245, quoted by Stotzky and Babich, (1986)
16. Foster, T.J.: Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Rev.* 47 (1983), 361 - 409
17. Gadd, G.M., and Griffiths, A.J.: Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbiol. Ecolog.* 4 (1978), 303 - 317
18. Glassman, D.L., and McNicol, L.A.: Plasmid frequency in natural populations of estuarine microorganisms. *Plasmid.* 5 (1981), 231
19. Gowland, P.C., and Slater, J.H.: Transfer and stability of drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K12. *Microbial. Ecolog.* 10 (1984), 1 - 13
20. Grabow, W.O.K., and Nupen, E.M.: The load of infectious microorganisms in the waste water of two South African hospitals. *Water Res.* 6 (1972), 1557 - 1563
21. Grabow, W.O.K., and Prozesky, O.W.: Drug resistance of coliform bacteria in hospital and city sewage. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 3 (1973), 175 - 180
22. Grabow, W.O.K., Middendorff, I.G., and Prozesky, O.W.: Survival in maturation ponds of coliform bacteria with transferable drug resistance. *Water Res.* 7 (1973), 1589 - 1597
23. Grabow, W.O.K., Prozesky, O.W., and Burger, J.S.: Behaviour in a river and dam of coliform bacteria with transferable or non-transferable drug resistance. *Water Res.* 9 (1975), 777 - 782
24. Grabow, W.O.K., Prozesky, O.W., and Smith, L.S.: Drug resistant coliforms call for review of water quality standards. *Water Res.* 8 (1974), 1 - 9
25. Grinsted, J., Bennett, P.M., Higginson, S., and Richmond, M.H.: Regional preference of insertion of Tn501 and Tn802 into RP1 and its derivatives. *Molecular and General Genetics.* 166 (1978), 313 - 320

26. Guinée, P.A.M., Ugneto, N., and van Leeuwen, N.: *Escherichia coli* with resistance factors in vegetarians, babies and non vegetarians. *Appl. Microbiol.* 50 (1970), 531 - 535
27. Hada, H.S., and Sizemore, R.K.: Incidence of plasmids in marine Vibrios spp. isolated from an oil field in the Northwestern Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1981), 199 - 202
28. Hawkey, P.M., Penner, J.L., Linton, A.H., Hawkey, C.A., Crisp, L.J., and Hinton, M.: Speciation, serotyping, antimicrobial sensitivity and plasmid content of Proteaceae from the environment of calf-rearing units in South West England. *J. Hyg. Camb.* 97 (1986), 405 - 417
29. Hinton, M., and Linton, A.H.: The survival of multi-antibacterial drug resistant *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in stored static slurry from a veal calf unit. *J. Hyg. Camb.* 88 (1982), 557 - 565
30. Hinton, M., Hampson, D.J., Hampson, E., and Linton, A.H.: A comparison of the ecology of *Escherichia coli* in the intestine of healthy unweaned pigs and pigs after weaning. *J. Appl. Bact.* 54 (1985), 471 - 478
31. Hinton, M., Hedges, A.J., and Linton, A.H.: The ecology of *Escherichia coli* in calves fed a milk substitute diet. *J. Appl. Bact.* 58 (1985), 27 - 35
32. Hinton, M., Linton, A.H., and Hedges, A.J.: The ecology of *Escherichia coli* in calves reared as dairy-cow replacements. *J. Appl. Bact.* 58 (1985), 131 - 138
33. Hinton, M., Rixson, P.D., Allen, V., and Linton, A.H.: The persistence of drug resistant *Escherichia coli* strains in the majority faecal flora of calves. *J. Hyg. Camb.* 93 (1984), 547 - 557
34. Hughes, V.M., and Datta, N.: Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre- antibiotic' era. *Nature* 302 (1978), 725 - 726
35. Jobling, M.G.: Physical and genetic analysis of heavy metal resistance plasmids. Ph. D. Thesis, University of Liverpool (1985)
36. Jobling, M.G., Peters, S.E., and Ritchie, D.A.: Plasmid-borne mercury resistance in aquatic bacteria. *F.E.M.S. Microbiol. Letters* 49 (1988), 31 - 37

37. Joly, B., and Cluzel, R.: Study of the Hg^R in hospital enterobacteria: genetic and epidemiologic aspects. Annals. Microbiologie 129A (1978), 167 - 176
38. Jones, J.G.: Antibiotic resistance in aquatic bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 18 Supl. C (1986), 149 - 154
39. Jones, J.G., Gardener, S., Simon, B.M., and Pickup, R.W.: Antibiotic resistant bacteria in Windermere and two remote upland tarns in the English Lake District. J. Appl. Bact. 60 (1986a), 443 - 453
40. Jones, J.G., Gardener, S., Simon, B.M., and Pickup, R.W.: Factors affecting the measurement of antibiotic resistant bacteria isolated from lake water. J. Appl. 60 (1986b), 455 - 462
41. Kado, C.I., and Lin, S.T.: A rapid procedure for the detection and isolation of large and small plasmids. Journal of Bacteriology. 143 (1981), 1365 - 1373
42. Kelch, W.J., and Lee, J.S.: Antibiotic resistance patterns of Gram negative bacteria isolated from environmental sources. Appl. Environ. Microbiol. 36 (1978), 450 - 456
43. Kelly, W.J., and Reannay, D.: Mercury resistance among soil bacteria: ecology and transferability of genes encoding resistance. Soil Biol. Biochem. 16 (1984), 1 - 8
44. Khesin, R.B., and Karasyova, E.C.: Mercury-resistant plasmids in bacteria from a mercury and antimony deposit area. Mol. gen. Genet. 197 (1984), 280 - 285
45. Koberi, H., Sullivan, C.W., and Shizuya, H.: Bacterial plasmids in Antarctic natural microbial assemblages. Appl. Environ. Microbiol. 48 (1984), 515 - 518
46. Levy, S.B.: Antibiotic-resistant bacteria in food of man and animals, p. 525 - 531. In: M. Woodbine (ed.), Antimicrobials and Agriculture. Butterworth, London (1984)
47. Levy, S.B., Clowes, R.C., and Koenig, E.L. (eds.): Molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmids. pp. 708 Plenum, New York, (1981)

48. Linton, A.H.: Antibiotics, Animals and Man - an appraisal of a contentious subject, pp. 315 - 343. In: M. Woodbine (ed.) Butterworth, London (1976)
49. Linton, A.H.: Antibiotic resistance: the present situation reviewed. *Vet. Rec.* 100 (1977), 354 - 360
50. Linton, A.H.: Flow of resistance genes in the environment and from animals to man. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 Suppl. C (1986), 189 - 197
51. Linton, A.H., and Hinton, M.: The ecology of antibiotic-resistant bacteria in animals and their environment, pp. 533 - 549. In: M. Woodbine (ed.) *Antimicrobials and Agriculture*. Butterworth, London (1984)
52. Linton, A.H., and Richmond, M.H.: Antibiotic and sulphonamides in the environment, pp. 137 - 150. In: T.H. Jukes, L.H. Dupont and L.M. Crawford (eds.) *Handbook Series in Zoonoses. Section D. Vol. 1*. C.R.C. Press, Florida (1984)
53. Linton, A.H., Timoney, J.F., and Hinton, M.: The ecology of chloramphenicol resistance in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in calves with endemic *Salmonella* infection. *J. App. Bact.* 50 (1981), 328 - 331
54. Linton, K.B., Lee, P.A., Richmond, M.H., Gillespie, W.A., Rowland, A.J., and Baker, V.N.: Antibiotic resistance and transmissible R-factors in the intestinal coliform flora of healthy adults and children in an urban and a rural community. *J. Hyg. Camb.* 70 (1972), 99 - 104
55. Linton, K.B., Richmond, M.H., Bevan, R., and Gillespie, W.A.: Antibiotic resistance and R factors in coliform bacilli isolated from hospital and domestic sewage. *J. Med. Microbiol.* 7 (1974), 91 - 103
56. Mach, P.A., and Grimes, D.J.: R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1982), 1395 - 1403
57. McNicol, L.A., Aziz, K.M.S., Huq, I., Kaper, J.B., Lochman, H.A., Remmers, E.F., Spira, W.M., Voll, M.J., and Colwell, R.R.: Isolation of drug-resistant *Aeromonas hydrophila* from aquatic environments. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 17 (1980), 477 - 483
58. Marques, A.M., Congregado, F., and Simon-Pujol, D.M.: Antibiotic and heavy metal resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soils. *J. Appl. Bact.* 47 (1979), 347 - 350

59. Mooi, F.R., de Graaf, F.K., and van Embden, J.D.A.: Cloning, mapping and expression of the genetic determinant that encodes for K88ab antigen. *Nucl. Acids Res.* 6 (1979), 849 - 865
60. Nakahara, H., Ishikawa, T., Sarai, Y., Kondon, J., Kozukue, H., and Silver, S.: Linkage of mercury, cadmium, arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (1977), 470 - 476
61. Nelson, J.D., and Colwell, R.R.: The ecology of mercury resistant bacteria in Chesapeake Bay. *Microbiol. Ecolog.* 1 (1975), 191 - 218
62. Niemi, M., Sibakov, M., and Niemala, S.: Antibiotic resistance among different species of faecal coliforms isolated from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1983), 79 - 83
63. Porter, F.D., Silver, S., Ong, C., and Natahara, H.: Selection for mercurial resistance in hospital sewage. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 22 (1982), 852 - 858
64. Richmond, M.H., and John, M.: Co-transduction by staphylococcal phage of genes responsible for penicillinase synthesis and resistance to mercury salts. *Nature* 202 (1964), 1360 - 1364
65. Sagik, B.P., Sorber, C.A., and Morse, B.E.: The survival of EK1 and EK2 systems in sewage treatment plant models, p. 449 - 460. In: S.B. Levy, R.C. Clowes and E.L. Koenig (eds.). *Molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmids*. Plenum, New York. (1981)
66. Sanchez, J., Bennett, P.M., and Richmond, M.H.: Expression of Elt-B, the gene encoding the B subunit of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*, when cloned in pACYC 184. *F.E.M.S. Microbiol. Letters*, 14 (1982), 1 - 5
67. Shaw, D.R., and Cabelli, V.J.: R-plasmid transfer frequencies from environmental isolates of *Escherichia coli* to laboratory and faecal strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 (1980), 756 - 764
68. Simon, R.D., Shilo, M., and Hastings, J.W.: *Curr. Microbiol.* 7 (1982), 175 - 180 quoted by Stotzky and Babich (1986)

69. Sjogren, R.E., and Port, J.: Heavy metal-antibiotic resistant bacteria in a lake recreational area. *Water, Air and Soil Pollution.* 15 (1981), 29 - 44
70. Smith, H.W.: Thermosensitive transfer factor in chloramphenicol-resistant strains of *Salmonella typhi*. *Lancet ii* (1974), 281 - 282
71. Smith, H.W.: Incidence in river water of *Escherichia coli* containing R factors. *Nature* 228 (1970), 1286 - 1288
72. Smith, P.R., Farrell, E., and Duncan, K.: Survival of R+ *Escherichia coli* in sea water. *Appl. Microbiol.* 27 (1974), 983 - 984
73. Stanisich, V., Bennett, P.M., and Richmond, M.H.: Characterisation of a translocation unit encoding resistance to mercuric ions occurs on a non-conjugative plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bact.* 129 (1977), 1227 - 1233
74. Stotzky, G., and Babich, H.: Survival of, and Genetic Transfer by, genetically engineered bacteria in natural environments. *Adv. Appl. Microbiol.* 31 (1986), 93 - 138
75. Sturtevant, A.B., and Feary, T.W.: Incidence of infection drug resistance among lactose-fermenting bacteria isolated from raw and treated sewage. *Appl. Microbiol.* 18 (1969), 918 - 924
76. Talbot, H.W., Yamamoto, D.Y., Smith, M.W., and Seidler, R.J.: Antibiotic-resistance and its transfer among clinical and non-clinical strains in botanical environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 (1980), 97 - 104
77. Taylor, D.E., and Burrows, M.R.: The survival of *Escherichia coli* and *Salmonella dublin* in slurry on pasture and the infectivity of *Salm. dublin* for grazing calves. *Bri. vet. J.* 127 (1971), 536 - 543
78. Timoney, J.F., and Linton, A.H.: Experimental ecological studies on H2 plasmids in the intestine and faeces of the calf. *J. Appl. Bact.* 52 (1982), 417 - 424
79. Timoney, J.F., Port, J., Giles, J., and Spanier, J.: Heavy metal and antibiotic resistance in the bacterial flora of sediments of the New York Bight. *Appl. Environ. Microbiol.* 36 (1979), 465 - 472

80. Trevors, J.T., Oddie, K.M., and Belliveau, B.: Metal resistance in bacteria. *F.E.M.S. Microbiol. Rev.* 32 (1985), 39 - 54
81. Vernon, J.D.R.: Feeding habits and food of the black-headed and common gulls. 1. Feeding habits. *Bird Study* 17 (1970), 287 - 296
82. Watanabe, T., Acki, T., Ogata, Y., and Egusa, S.: R factors related to fish culturing. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 182 (1971), 383 - 410
83. Wood, J.M., and Wang, H.-K.: Microbial resistance to heavy metals. *Environ. Sci. Techn.* 17 (1983), 585 - 590

Table 1: Environments investigated for the presence of plasmid-bearing bacteria, with references

hospital wastes	Fontaine & Hoadley, 1976 [15]
raw sewage	Linton et al., 1974 [55] Fontaine & Hoadley, 1976 [15] Bell et al., 1981 [8] Corliss et al., 1981 [12]
waters receiving sewage effluents	Sturtevant & Freary, 1969 [75] Grabow & Prozesky, 1973 [21] Bell et al., 1981 [8]
sediments from off-shore sewage dump sites and coastal sediments	Timoney et al., 1978 [79] Grabow et al., 1975 [23]
fresh and marine recreational waters	Smith, 1970, 1971 [71, 72] Freary et al., 1972 [13] Smith et al., 1974 [72]
estuaries	McNicol et al., 1980 [57]
rivers commercial fisheries	Kelch & Lee, 1978 [42] Watanabe et al., 1971 [82]
plants	Talbot et al., 1980 [76]
soils	Cole & Elkan, 1979 [11]
drinking water	Armstrong et al., 1981 [2]
voided calf faeces	Timoney & Linton, 1982 [78]
stable bedding	Linton & Hinton, 1984 [51]
fresh vegetables and fruit	Levy, 1984 [46]

Table 2: Antibiotic-resistant Gram-negative bacteria from market produce (after Levy, 1984)

Vegetable	No. examined	Mean count+S.D.	Colony (mean %)	Mean % 1 resistance	Mean % 2 resistance
Carrot	3	$1.1 \pm 8 \times 10^6$	lac ⁺ 25.2 lac ⁻ 74.8	53.4 87	31.4 76.1
Celery	11	$6.2 \pm 7.4 \times 10^5$	lac ⁺ 6.6 lac ⁻ 93.4	84.8 81.5	83 63
Cucumber	12	$4.8 \pm 4.9 \times 10^5$	lac ⁺ 9.0 lac ⁻ 91	39.7 82.9	20 80.5
Lettuce (whole)	9	$5.0 \pm 5.0 \times 10^5$	lac ⁺ 0.6 lac ⁻ 99.4	N.A. 73.3	N.A. 46.7
Lettuce (outside leaves)	3	$4.7 \pm 4 \times 10^4$	lac ⁺ 26.2 lac ⁻ 73.8	64.3 81.4	53 49.3
Lettuce (inside leaves)	4	$5.6 \pm 5.7 \times 10^1$	lac ⁺ 0 lac ⁻ 100	N.A. 100	N.A. 100
Pepper	10	$2.68 \pm 4.7 \times 10^6$	lac ⁺ 15.4 lac ⁻ 84.6	63.3 80	56.4 63.2
Tomato	13	$9.3 \pm 8.6 \times 10^4$	lac ⁺ 11.7 lac ⁻ 88.3	73.9 87.9	50.7 73.6

N.A. not applicable

Table 3: The pool of antibiotic resistance in the bacterial population in Windermere lake water (Jones et al., 1986a)

Bacterial group	Population size range (cfu/ml)	Antibiotic resistance index (ARI)
Faecal streptococci	5×10^{-3} - 1.5×10^{-1}	0.13
Total coliforms	1×10^{-1} - 5×10^0	0.14
E. coli	1×10^{-3} - 1×10^0	0.25
Pseudomonas spp.	1×10^1 - 1×10^2	0.38
Aquatic bacteria	5×10^3 - 5×10^4	0.17

Table 4: Examples of differences in antibiotic resistance among Pseudomonas spp. isolated from Windermere lake water and a sewage effluent (data from Jones et al., 1986b)

	% Resistance to:						
	Cm	Cx	Em	1	2	3	4
P. aeruginosa	9	11	71	23	69	0	9
P. putida	42	54	40	28	25	25	21
P. fluorescens	3	3	98	2	92	5	1
Pseudomonas spp. ^a	7	26	76	6	76	4	7
Pseudomonas subset ^b	0	0	95	5	95	0	0

^aNot identified as species listed

^bA group of isolates from water which had identical API test profile but could not be identified satisfactorily to species level

Cm: chloramphenicol,

Cx: erythromycin

Em: cotrimoxazole

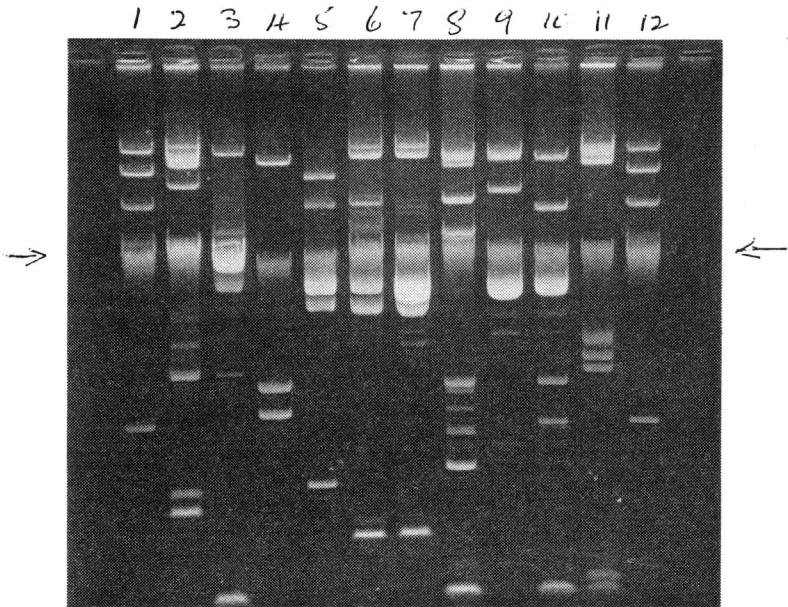


Fig. 1: Plasmid of strains of *Escherichia coli* isolated from slurry from a commercial veal calf unit. The isolates illustrated, and their O-serogroups, are as follows: MVA14, 09 (tracks 1 + 12); MVC5, 026 (track 2); MV9 015 (track 3); MVS25, 024 (track 4); MVT25, 0100 (track 5); MVA4, 040 (track 6); MVC28, 040 (track 7); MVT17, 014 (track 8); MVK1, 019 (track 9); MVS7, 080 (track 10); M4, 0103 (track 11). All strains were multiply-resistant. Plasmid DNA was isolated essentially as described by Kado and Lin (1981), and plasmid species were separated on 0.8% (w/v) agarose gels in a trisborate buffer, pH 7.5 (Grinsted et al. 1978). Fragment DNA (plasmid and chromosome) is indicated by the arrows. (Heard + Bennett, unpublished)

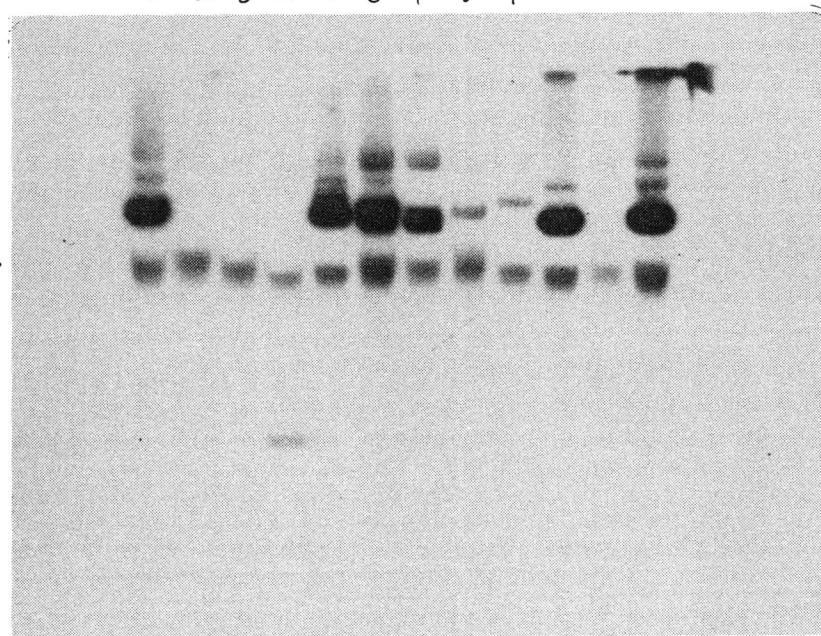


Fig. 2: Homology between plasmids in strains of *Escherichia coli* isolated from veal calf slurry and a resistance plasmid isolated from one of them. The plasmid profiles tested were those illustrated in Figure 1. The DNA probe used was a plasmid from MVA14 (tracks 1 + 12) that conferred resistance to streptomycin and trimethoprim. The strong bands apparent in tracks 1, 5, 6, 7, 10 and 12 are interpreted as an indication of extensive sequence homology between the plasmid in the isolate and the probe plasmid. Less intense bands are interpreted as an indication of some homology that does not extend to the entire sequence of the plasmid that was probed. Fragment DNA (plasmid and chromosome) is indicated by the arrows (Heard and Bennett, unpublished)

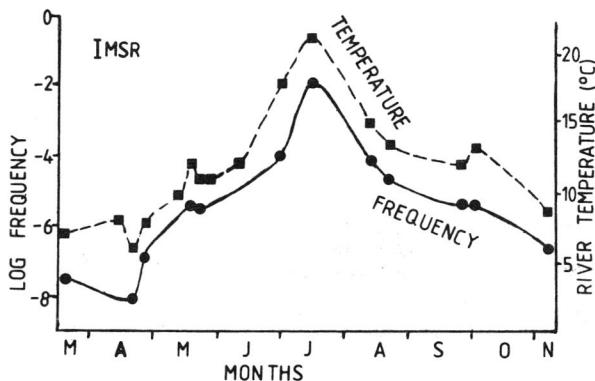


Fig. 3: Variation of the in situ transfer of pQM1 and river temperature. Transfer frequency (\log_{10}) per recipient (○) and river temperature (●) were obtained during 24 hour mating between *Pseudomonas aeruginosa* PA02002Arg (pQM1) and PU21. Matings were on membrane filters attached to sterile, scrubbed stones in the Taff feeder canal between March and November, 1986. Frequencies are the means of results from the filter and stone surfaces on each date. (MSR=minimum significant range (transfer frequencies only) (after Bale, Fry and Day, 1988)

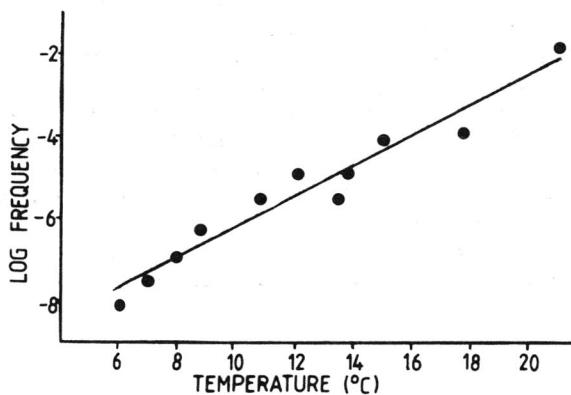


Fig. 4: Linear regression of transfer frequencies of pQM1 against river temperature. Details are as for figure 3 (after Bale, Fry and Day, 1988).

Strain No.

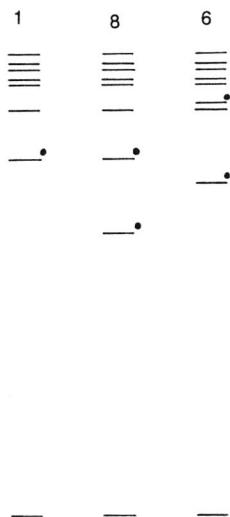


Fig. 5: Diagram of the plasmid profiles of three *Escherichia coli* isolates after passage of the parent strain through a pig. Strain 1 was the parent strain (O45 serogroup carrying plasmid pJB3744 marked by a solid circle). Strain 8 was another isolate which contains a band corresponding to pJB3744 and an additional band with a high level of DNA homology with pJB3744. Strain 6, another isolate, does not have bands corresponding to pJB3744 but does have two other bands, one larger and one smaller, each with strong homology with the parent plasmid (Bennett and Brito, unpublished).

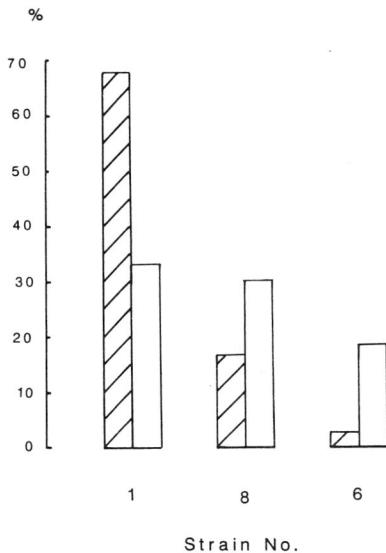


Fig. 6: Histogram of the precentage isolation of the parent strain (1), and the variants (8 and 6), as described in Figure 5, after the parent strain had been passaged for 10 days through a pig (non-hatched area) and after storage on Dorset's egg medium for more than 12 months (Bennett and Brito, unpublished).

Selektion und Verwendung von Mikroorganismen für die Metabolisierung von Umweltchemikalien am Beispiel der chlorierten Aromaten

W. Reineke

ZUSAMMENFASSUNG

Bakterienstämme, die Chloraromaten verwerten, können durch selektive Anreicherungsbedingungen aus der Natur isoliert werden. Die Entwicklung von Stämmen mit verbesserten Abbaueigenschaften ist sowohl durch konjugative Eigenschaftsübertragung als auch Genklonierung möglich. Es werden Verfahren für die Gewinnung von Stämmen vorgestellt, die mono- und dihalogensubstituierte Aromaten als Substrat nutzen können.

Anhand von Ergebnissen von Laboruntersuchungen wird die Möglichkeit der Verwendung von Spezialstämmen im industriellen Abwasserbereich sowie bei der Sanierung von kontaminierten Böden diskutiert.

EINLEITUNG

Normalerweise unterliegen nicht nur die Naturstoffe der Mineralisierung, sondern auch Verbindungen wie die durch abiotische Prozesse entstandenen Alkane und Arene. Auch sehr viele synthetische Verbindungen werden durch Mikroorganismen abgebaut. Gewisse Syntheseprodukte nehmen jedoch eine Sonderstellung ein, da sie Strukturelemente wie Halogensubstituenten oder Nitrogruppen enthalten, welche in Naturstoffen selten oder überhaupt nicht vorkommen. Mikroorganismen haben im Laufe der Evolution vielfältige Abbauaktivitäten für biosynthetisch entstandene Verbindungen wie auch Alkane und Arene hervorgebracht. Die entsprechenden Abbauenzyme sind jedoch für viele Fremdstoffe relativ unwirksam, so daß nur langsamer oder kein Abbau erfolgt. Eine Klasse von Fremdstoffen bildet die chlorierten aromatischen Kohlenwasserstoffe. Im folgenden sollen am Beispiel dieser Fremdstoffklasse, die wegen ihrer leichten Nachweisbarkeit und Allgegenwärtigkeit die Aufmerksamkeit der Öffentlichkeit

auf sich gezogen hat, Möglichkeiten und Strategien diskutiert werden, wie Organismen, die diese Substanzen abbauen können, isoliert werden können. Im zweiten Teil soll ein möglicher Einsatz von Spezial-Organismen bei der Dekontaminierung von Böden und Reinigung von Industrieabwässern diskutiert werden.

COMETABOLISMUS - TOTALABBAU

Das Schicksal von Fremdstoffen in der Umwelt wird im wesentlichen durch abiotische Prozesse und durch den sogenannten Cometabolismus der Mikroorganismen bestimmt. Durch die in den Bakterienzellen vorhandenen Enzyme für den Abbau von Naturstoffen werden die Fremdstoffmoleküle dabei zufällig ohne Gewinn von Energie oder Synthesebausteinen umgesetzt (Abb. 1). Dieser Prozeß verläuft sehr langsam und führt in der Regel nur zur Bildung von chlorhaltigen Metaboliten. Totalabbau mit Freisetzung von Chlorid kann nur durch eine Kaskade von cometabolischen Schritten durch bakterielle Mischpopulationn erfolgen. Für einige Chloraromaten findet jedoch auch Totalabbau durch Reinkulturen statt. Dieser ist gekennzeichnet durch exponentielle Zunahme an Zellzahl, welche mit dem Verschwinden des Substrates und gleichzeitiger Freisetzung von Chlorid korreliert ist. Im folgenden sollen nur solche Organismen diskutiert werden, die in der Lage sind, Chloraromaten als Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten.

DEHALOGENIERUNGSMECHANISMEN

Der biologische Abbau von Halogenaromaten ist nur dann vollständig, wenn sowohl das Kohlenstoffgerüst in intermediäre Metabolite überführt als auch das organisch gebundene Halogen als Halogenid freigesetzt wird. Der kritische Punkt dabei ist die Eliminierung des Halogensubstituenten. Die vier bekannten Mechanismen der mikrobiellen Dehalogenierungen von Halogenaromaten sind in Abbildung 2 schematisch zusammengefaßt. Dehalogenierung als erster Schritt des Abbaus kann durch hydrolytische, oxygenolytische oder reduktive Eliminierung des Halogensubstituenten erfolgen. Eine andere Möglichkeit, die beim Abbau von Haloaromaten beobachtet wurde, beinhaltet die spontane Eliminierung des Halogensubstituenten durch Hydrolyse oder β -Eliminierung aus einem nicht aromatischen Intermediat.

Die **hydrolytische Dehalogenierung**, bei der der Halogensubstituent durch eine Hydroxylgruppe aus dem Wasser ersetzt wird, ist für 3-Chlor- [27] und 4-Chlorbenzoat [8, 30, 31, 36, 37, 41, 50, 68, 70, 71] beschrieben worden. Es gibt Andeutungen, daß auch aus Pentachlorphenol der erste Chlorsubstituent hydrolytisch eliminiert wird [1].

Die **oxygenolytische Eliminierung** des Chlorsubstituenten ist bisher für 2-Chlorbenzoat [72], 2-Fluorbenzoat [20, 24, 40] und 4-Chlorphenylacetat [32, 38] gezeigt worden. Bei dieser Reaktion stammt der Sauerstoff der Hydroxylgruppe aus der Luft. Eine Dioxygenase lagert dabei den Sauerstoff so an den Aromaten, daß die beiden Hydroxylgruppen nach Reduktion geminal und vicinal zum Halogensubstituenten stehen. Aus dem *cis*-Dihydrodiol eliminiert spontan Halogenid, so daß ein 1,2-Diphenol resultiert, welches dem weiteren Abbau durch eine ringspaltende Dioxygenase zugänglich gemacht wird.

Die **reduktive Eliminierung** des Chlorsubstituenten durch Wasserstoff ist für chlorierten Benzoate [14, 59, 62], Phenole [5, 6, 39] und 1,2,4-Trichlorbenzol [65, 66] gezeigt worden. Sie findet durch Konsortien unter methanogenen Bedingungen statt.

Die vierte Möglichkeit erscheint auf den ersten Blick weniger sinnvoll. Bei ihr müssen erst sehr viele chlorsubstituierte Intermediate durchlaufen werden, bevor der Chlorsubstituent eliminiert wird. Der Abbau ist hierbei mit der ortho-Spaltung der Chlorbrenzcatechine verbunden. Die **Eliminierung** findet erst nach Ringspaltung statt, wie für eine Vielzahl von Chloraromaten gezeigt ist (s. Abb. 2).

ISOLIERUNG VON BAKTERIENKULTUREN, DIE CHLORAROMATEN VERWERTEN

Für die Herstellung von Spezialkulturen, die Chloraromatene abbauen, haben sich folgende Strategien bewährt:

- a) die Anreicherung aus der Natur,
- b) die Anreicherung aus der Natur mit nachfolgender Stammoptimierung oder Stammverbesserung im Labor,
- c) die Konstruktion von Organismen mittels Übertragung von DNA-Sequenzen durch Konjugation und
- d) die in vitro-Manipulation durch Übertragung von speziellen DNA-Sequenzen mittels Klonierungstechnik.

Bei der **Anreicherung** werden natürlich vorkommende Populationen aus Böden und Gewässern unter definierten, selektiven Bedingungen in Gegenwart nicht-toxischer Konzentrationen der Chloraromatene kultiviert. Da die Verbindung, die abgebaut werden soll, als wachstumslimitierende einzige Kohlenstoff- und Energiequelle im Kulturmedium vorhanden ist, sollten nur solche Organismen wachsen, die die notwendigen Abbauaktivitäten besitzen. Diese Organismen sollten die große Anzahl der anderen Organismen überwachsen, die am Beginn des Experiments in der Population vorhanden waren. Eine den Fremdstoff abbauende Kultur müßte sich also in wenigen Wochen isolieren lassen, soweit überhaupt ein den Chloraromatene verwertender Organismus in der natürlichen Po-

pulation vorhanden ist. Die Wahl des geeigneten Impfmaterials ist also von großer Wichtigkeit. Wie am Beispiel der Isolierung eines Chlorbenzolverwerter deutlich wurde [48], muß das Verständnis der Vorgänge in einer Anreicherungskultur für Chloraromaten jedoch überdacht werden. Es zeigte sich nämlich, daß für die Isolierung des Stammes WR1306 ein sehr langer Zeitraum (9 Monate) notwendig war, bevor eine Reinkultur isoliert werden konnte. Dies deutet an, daß es sich bei der Isolierung nicht nur um die Anreicherung des Organismus aus der natürlichen Population handelte, sondern erst genetische Veränderungen erfolgen mußten, bevor eine den Chloraromaten verwertende Kultur vorlag. Auch andere Arbeitsgruppen berichteten von sehr langen Zeiträumen für die Isolierung von Chloraromatenverwertern. Marks et al. [36] benötigten Monate, bevor ein Arthrobacter Stamm isoliert werden konnte, der mit 4-Chlorbenzoat wachsen konnte. Ähnliches berichteten auch Spain und Nishino [60] bei der Isolierung eines Pseudomonas, der 1,4-Dichlorbenzol als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann.

Die **Anreicherung aus der Natur mit nachfolgender Verbesserung eines Stamms**, wie sie bei den oben aufgeführten Beispielen schon deutlich wurde, ist am Beispiel der Isolierung von Organismen, die 2-Fluorbenzoat verarbeiten, gut dokumentiert [20]. Der Pseudomonas Stamm B13, der auf 3-Chlorbenzoat wachsen kann, wurde an das Wachstum mit 2-Fluorbenzoat in einem Chemostat über 150 Tage (30 Volumenwechsel) adaptiert, indem das Wachstumssubstrat 3-Chlorbenzoat schrittweise durch 2-Fluorbenzoat ersetzt wurde. Der resultierende Stamm B13-1 wurde anschließend in stationärer Kultur über 250 Generationen mit 2-Fluorbenzoat inkubiert. Der verbesserte Stamm B13-2, der gut mit 2-Fluorbenzoat als Substrat wachsen kann, unterscheidet sich von dem Wildtypstamm B13 darin, daß er das 2-Fluorbenzoat zu 95% über den Weg a (Abb. 3) mit Brenzcatechin als Intermediat abbaut, während der Ausgangsstamm B13 nur 78% des 2-Fluorbenzoates über diesen Weg metabolisiert. Der Stamm B13 kann mit 2-Fluorbenzoat nicht wachsen, da er 22% des 2-Fluorbenzoates über 3-Fluorbrenzcatechin abbaut, welches sich in der Kultur akkumuliert und die Kultur abtötet. Der Stamm B13-2 wächst mit 2-Fluorbenzoat, da sich die Selektivität der Benzoat-1,2-Dioxygenase zugunsten des Abbaus über 2-Fluordihydroxybenzoat verändert hat. Bei ihm werden nur noch 5% zum 3-Fluorbenzcatechin, dem toxischen Metaboliten, umgesetzt. Eine andere Strategie der Vermeidung der Akkumulation des toxischen Metaboliten läßt sich anhand des Organismus Alcaligenes eutrophus zeigen, der mit Benzoat als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann. Er setzt 2-Fluorbenzoat zu 80% über den Weg a um, so daß große Mengen an 3-Fluorbenzcatechin gebildet werden. Die Akkumulation des toxischen 3-Fluorbenzcatechins wird in der Mutante Alcaligenes eutrophus B9 durch eine Mutation in der Dihydrodihydroxybenzoat-Dehydrogenase verhindert. Das 6-Fluordihydrodihydroxybenzoat wird nicht weiter umgesetzt. Wachstum findet also aufgrund der Verwertung von Brenzcatechin nach spontaner Fluorid-Eliminierung aus 2-Fluordihydrodihydroxybenzoat statt.

Die Bildung neuer funktionsfähiger Abbauwege für Chloraromaten lässt sich erzielen, wenn man geeignete Partnerstämme mit komplementären Abbausequenzen zusammenbringt. Diese in vivo-Konstruktion von Abbaustämmen durch Plasmidübertragung ist am Beispiel des Chloraromatenabbaus leicht zu realisieren. In Abbildung 4 ist dies schematisch dargestellt [46]. Für eine vollständige Abbausequenz werden zwei Teilsequenzen benötigt:

- eine periphere Sequenz aus Methylaromaten verwertenden Stämmen, die in der Lage sind, die chloranalogen Substrate bis zu den chlorierten Brenzcatechinen umzusetzen, und
- eine Chlorbenzcatechine abbauende Sequenz, wie wir sie in Pseudomonas Stamm B13 für den Abbau von 3-Chlor-, 4-Chlor- und 3,5-Dichlorbrenzcatechin gefunden haben.

Beide Teilsequenzen werden konjugativ in einem Stamm etabliert und bilden einen hybriden Abbauweg für den Totalabbau von Chloraromaten, wobei als Endprodukte Chlorid, CO_2 und Biomasse aus dem Abbau resultieren. Voraussetzung für eine erfolgreiche in vivo-Konstruktion ist das Vorhandensein von peripheren Sequenzen, die in der Lage sind, Chloraromaten bis zu den Chlorbrenzcatechinen umzusetzen, die aber auch durch die Chloraromaten induzierbar sein müssen. Abbildung 5 zeigt denkbare periphere Sequenzen. Gemeinsam haben diese Sequenzen, die ihrer natürlichen Funktion entsprechend den Abbau von Biphenyl, Xylool, Phenol, Benzol, Anilin oder Naphthalin bewerkstelligen, daß bei ihnen die gebildeten Brenzcatechine über einen meta-Abbauweg mineralisiert werden. Die zentralen Abbausequenzen für 3-Chlor-, 4-Chlor- und 3,5-Dichlorbenzcatechin, wie bisher in Pseudomonas Stamm B 13 nachgewiesen [16, 17, 51, 54, 56], zeigt die Abbildung 6. Eine erfolgreiche Konstruktion wird dadurch erleichtert, daß sowohl die peripheren als auch die zentralen Abbausequenzen auf konjugative Plasmiden lokalisiert sind [s. Zusammenstellung in 44].

Die hier skizzierte Konstruktion von hybriden Abbauwegen mittels konjugativem Plasmidtransfer ist für eine Vielzahl von mono- und dichlorsubstituierten Aromaten realisiert worden - so für die chlorierten Phenole [57], Aniline [33], Benzoate [46, 47], Benzole [35, 42, 69], Salicylate [49] und Toluole [35; Reineke, nicht publizierte Ergebnisse]. Um den Vorteil gegenüber der Anreicherung zu dokumentieren, sei auf den Zeitbedarf zur Isolierung eines Chlorbenzolverwerters von 3 - 4 Wochen mittels Konstruktion verwiesen im Gegensatz zu 9 Monaten, die notwendig waren, bevor aus der Natur der Chlorbenzolverwerter WR1306 isoliert werden konnte.

Auf den Plasmiden sind jedoch nicht nur die gewünschten peripheren Sequenzen kodiert, sondern auch der meta-Weg, der für den Abbau von Chloraromaten ungeeignet ist. Wie in den Hybridstämmen dennoch ein Abfließen in die Sackgasse des meta-Weges vermieden wird, sei für die bisher untersuchten Ringspaltungssubstrate 3-Chlor-, 4-Chlor- und 3,5-Dichlorbrenzcatechin gezeigt

(Abb. 7). Entscheidend für den Totalabbau über den ortho-Weg sind das Vorhandensein der beiden ringspaltenden Dioxygenasen sowie ihr Verhalten gegenüber den chlorierten Brenzcatechinen. Das meta-spaltende Enzym Catechol-2,3-Dioxygenase (C23O) ist häufig auch ohne Induktion in hoher Menge in den Zellen vorhanden. Seine Induktion erfolgt von oben so z.B. durch die Toluate bei der TOL Plasmid kodierten C23O aus Pseudomonas putida Stamm PaW1. Das ortho-spaltende Enzym Catechol-1,2-Dioxygenase (C12O) wird hingegen durch sein Produkt, die cis,cis-Muconäure, induziert. Der Basiselevel ist sehr gering.

Das Abfließen von 3-Chlorbrenzcatechin in den meta-Weg wird wie folgt vermieden: Beide Enzyme haben Aktivität mit 3-Chlorbrenzcatechin. Die C23O bildet jedoch ein Säurechlorid [2], welches mit basischen Gruppen im katalytischen Zentrum des Enzyms reagiert. Es kommt zur Suizid-Inaktivierung der C23O. Ein Abfließen in den meta-Weg wird so vermieden und die Induktion der C12O kann erfolgen.

Für das 4-Chlorbrenzcatechin ist ein anderer Mechanismus notwendig. Beide Enzyme haben hohe Aktivität mit 4-Chlorbrenzcatechin. Die Induktion der C23O bewirkt ein Abfließen des 4-Chlorbrenzcatechins in den meta-Weg. Konsequenz davon ist, daß kein Induktor für die ortho-spaltende Aktivität zur Verfügung steht. Am Beispiel der Verwertung von 4CB durch Pseudomonas Stamm B13 TOL-Derivate wurde gezeigt, daß der meta-Weg abgeschaltet werden kann, indem das Gen für die C23O durch eine Insertion von 3,2 Kb oder Punktmutation inaktiviert wird [26, 45].

In Analogie zum Suizid-Mechanismus durch 3-Chlorbrenzcatechin war aus 3,5-Dichlorbrenzcatechin durch meta-Spaltung ebenfalls ein Säurechlorid zu erwarten. Ein Abfließen von 3,5-Dichlorbrenzcatechin in den meta-Weg wird jedoch anders als beim 3-Chlorbrenzcatechin dadurch vermieden, daß die C23O nur sehr geringe Aktivität und sehr geringe Affinität zum 3,5-Dichlorbrenzcatechin mit einem K_m -Wert von 14 mM hat (Reineke, nicht publizierte Ergebnisse). Die C12O zeigt hohe Affinität zum Substrat mit einem K_m -Wert von 0,3 μM und hohe Aktivität [17].

Anstelle der Einführung des gesamten TOL Plasmides nach Stamm B13 haben Lehrbach et al. [34] bestimmte Gene nach B13 kloniert. Die Gene für die Toluat-Dioxygenase (xylD) sowie die Dihydrodihydroxytoluat-Dehydrogenase (xylL) plus den Operon Promoter P_m sowie xylS, das Gen für den positiven Regulator von P_m , wurden in den Vektor pKT231 kloniert. Stamm B13, der das hybride Plasmid pPL403 enthielt, war in der Lage, mit 4CB und 3,5DCB zu wachsen, während Stamm B13 diese Substrate nicht verwertete. Zusätzlich klonierten Lehrbach et al. [34] das Gen nahG des Plasmides NAH7, welches für eine unspezifische Salicylat-Hydroxylase kodiert, nach pKT231. Das pKT231 hybride Plasmid, welches nahG enthielt, wurde nach Stamm B13 transformiert, so daß Stämme entstanden, die mit 3-, 4- und 5-Chlorsalicylat wachsen konnte.

Ein anderes Beispiel zur Erzeugung von Chloraromaten abbauenden Stämmen mittels **Klonierungstechnik** publizierten Ramos et al. [43]. Die Selektion von Mutanten mit Regulatorproteinen mit veränderter Effektorspezifität erlaubt, 3,5DCB⁺ Derivate von B13 (TOL) zu erzeugen. Um zu testen, ob ein Plasmid mit einem modifizierten *xylS* (*xylS*352) es erlaubt, daß Stamm WR216, ein B13 (TOL) Derivat, auf 3,5DCB wächst, transferierte Ramos das Plasmid pERD352 mit dem modifizierten *xylS* Gen nach WR216. Zum Vergleich wurde auch das Plasmid pNM185 mit dem Wildtyp-Gen *xylS* nach WR216 transferiert. Alle Transconjuganten, die pERD352 enthielten, waren in der Lage, mit 3,5DCB zu wachsen, während dies keine Transconjugante mit pNM185 vermochte.

Der Vorteil der *in vitro*-Manipulation gegenüber der *in vivo*-Konstruktion zeigt sich darin, daß die aufgeführten Probleme mit der Abschaltung des meta-Weges bei der Verwendung von bekannten Genen nicht auftreten. Die stärkste Einschränkung der *in vitro*-Manipulation liegt darin, daß erst sehr viele Informationen vorliegen müssen, bevor diese Strategie erfolgreich sein kann. Die bisher publizierten Ergebnisse zeigen zudem, daß sich auch durch *in vivo*-Konstruktion leicht Stämme mit dem gleichen Abbaupotential isolieren lassen.

DIE ANWENDUNG VON SPEZIALKULTUREN FÜR DEN ABBAU VON CHLORAROMATEN

Bevor die Anwendung von Spezialkulturen diskutiert wird, muß bewußt gemacht werden, in welcher Form Umweltchemikalien in der Natur auftreten. Zum einen findet man sie in niederen Konzentrationen als **non point sources** wie z.B. DDT, 1,4-Dichlorbenzol, oder Herbicide wie 2,4,5T. Zum anderen können sie aber auch in konzentrierter Form als **point sources** auftreten. Konzentrationen größer als 1 mg pro Liter findet man in Deponien, in Böden von Produktionsstätten, in Böden, die aufgrund von Unfällen kontaminiert sind, oder in industriellen Abwässern. Nur in solchen Fällen, in denen die Konzentrationen der Umweltchemikalien hoch sind, lässt sich an biotechnologische Beseitigung der Kontamination denken, während nach Verteilung und Verdünnung der Umweltchemikalien nur auf die Kräfte der Natur gehofft werden kann.

Während Ergebnisse zum mikrobiellen Abbau von Chloraromaten immer häufiger publiziert werden, steckt die Entwicklung von praktischen Prozessen und deren Anwendungen im industriellen Maßstab noch in den Anfängen. Tabelle 1 faßt Untersuchungen zur **Dekontaminierung von Böden** zusammen. Die überwiegende Zahl dieser Arbeiten hat gemeinsam, daß in ihnen der Boden im Labor kontaminiert und anschließend durch Ziimpfen von Spezialkulturen gereinigt wurde. Auf einige wenige Aspekte bei diesen Dekontaminierungen sei hingewiesen. Inokulation von Spezialkulturen zu Boden führt zur Verkürzung der Anlaufphase, so daß schneller potente, abbauende Populationen etabliert werden. Einige Untersuchungen zeigen, daß Abbau nur gewährleistet ist, wenn Or-

ganismen zugeimpft werden. Ein wichtiger Aspekt ist, daß immer Restkonzentrationen der Chloraromaten im Boden verbleiben. Am Beispiel des Abbaus von polychlorierten Biphenylen zeigten Brunner et al. [7], daß eine Inokulation eines Acinetobacter Stammes den Abbau nicht gewährleistet. Zufüttern des analogen Biphenyls hingegen reicht aus, die bodenständige polychlorierte Biphenyle abbauenden Populationen zu aktivieren. Untersuchungen zum Abbau von Pentachlorphenol im industriellen Maßstab wurden von Valo und Salkinoja-Salonen publiziert [67]. Sie untersuchten den Abbau von Pentachlorphenol im Boden einer Sägemühle. Es zeigte sich, daß der kontaminierte Boden schon Pentachlorphenol abbauende Organismen enthielt, so daß der Zusatz von Spezialkulturen nicht notwendig war. Über zwei Sommer wurde die Konzentration von 200 auf 15 µg Pentachlorphenol pro g Boden bei einem 70 m³-Versuch abgesenkt. Auch hier verblieb eine Restkonzentration von 30 µg Pentachlorphenol pro g Boden. Die Untersuchungen zeigten also, daß auch wirkliche Umweltchemikalien wie die höher chlorierten Phenole sowie die polychlorierten Biphenyle einem mikrobiellen Abbau im Boden zugänglich sind.

Die Verwendung von Spezialkulturen zur **Reinigung von industriellen Abwässern** wurde bisher nur für das Pentachlorphenol, Gemische von chlorierten Phenolen sowie das 3-Chlorbenzoat im Labormaßstab gezeigt (Tab. 2). Edgehill und Finn [18] dokumentierten eine Reduzierung der Anlaufphase für den Abbau von Pentachlorphenol bei Inokulation eines Pentachlorphenolverwerters. Am Beispiel des Abbaus der chlorierten Phenole sowie 3-Chlorbenzoat konnten Schmidt et al. [52, 53] zeigen, daß eine Population durch einen Spezialstamm, Pseudomonas Stamm B13, stabilisiert werden kann. Populationen, in denen der Stamm B13 fehlte, zeigten bei Erhöhung der Chlorphenol bzw. der 3-Chlorbenzoat-Konzentration im Chemostaten Instabilität. Solche Populationen wurden ausgewaschen. Die Konzentration der Chloraromaten im Medium erhöhte sich, was sich am Anstieg des DOC-Wertes zeigte.

Der gegenwärtige Stand der Grundlagenforschung zeigt am Beispiel der chlorierten aromatischen Kohlenwasserstoffe, daß Bakterien durch Adaptation, konjugative Eigenschaftsübertragung sowie Transfer von einzelnen Genen die Abbaueigenschaft für Fremdstoffe erhalten können. Eine Praxistauglichkeit der im Labor entwickelten Stämme läßt sich durchaus voraussagen.

Dennoch müssen einige Punkte beachtet werden. Im kontinuierlichen Betrieb einer Industriekläranlage bleibt die spezielle Abbauleistung für die Chloraromaten nur dann erhalten, wenn eine dauernde und gleichmäßige Belastung mit den Problemstoffen garantiert ist. Belastungspausen werden zwangsläufig ein Auswaschen der Spezialkulturen und damit einen irreversiblen Verlust der Abbaueigenschaften nach sich ziehen. Eine gleichmäßige Belastung und damit das Auftreten von Belastungsstößen ließe sich durch Vorratstanks erreichen. Eine optimale Reinigung der Abwasser würde erreicht, wenn eine individuelle Reinigung für die verschiedenen Abwasserströme der chemischen Industrie realisiert würde, welche die Bildung von Abwassermischungen mit schwierigen Reinigungs-eigenschaften vermeidet.

Bei kontaminierten Böden - so in Deponien - lässt sich das Problem des erschwertem Abbaus aufgrund der vorhandenen Vielzahl von Verbindungen nicht mehr rückgängig machen. Der Einsatz von Spezialkulturen bei der Sanierung von kontaminiertem Boden ist bei einer in situ-Sanierung, bei der im Boden in natürlicher Lage behandelt werden soll, durch zusätzliche Probleme gekennzeichnet. Aufgrund von nichthomogener Verteilung der Schadstoffe im Boden ist der Transport von Organismen und Minerallösungen an die kontaminierten Stellen nicht optimal. Als weiteres Problem stellt sich die Belüftung dar. Bei dem on site-Verfahren, bei dem der kontaminierte Boden ausgegraben wird, sind die letztgenannten Probleme beseitigt. Zudem lässt sich bei diesem Verfahren eine unbeabsichtigte Verbreitung der Organismen in der Umwelt vermeiden.

Bisher besitzen wir kaum Informationen, ob durch das Ausbringen von Organismen, die durch gentechnische Methoden hergestellt wurden (soweit sie überhaupt Vorteile gegenüber den durch natürliche Mechanismen erzeugten Stämmen haben), ökologische Folgen entstehen. Vor einer Ausbringung in die Umwelt müssen deshalb erst Informationen wie Überleben, Vermehrung, Verteilung und Gentransfer von Stämmen im Boden schrittweise durch Labor-, Gewächshaus- und Freilandversuche erarbeitet werden, um mögliche Risiken für die Umwelt und den Menschen auszuschließen.

LITERATUR

1. Apajalahti, J.H.A., and Salkinoja-Salonen, M.S.: Dechlorination and para-hydroxylation of polychlorinated phenols by Rhodococcus chlorophenolicus. *J. Bacteriol.* 169 (1987), 675 - 681
2. Bartels, I., Knackmuss, H.-J., and Reineke, W.: Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from Pseudomonas putida mt-2 by 3-halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984), 500 - 505
3. Bollag, J.-M., Helling, C.S., and Alexander, M.: Metabolism of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid by soil bacteria. *Appl. Microbiol.* 15 (1967), 1393 - 1398
4. Bollag, J.-M., Helling, C.S., and Alexander, M.: 2,4-D metabolism. Enzymatic hydroxylation of chlorinated phenols. *J. Agric. Food Chem.* 16 (1968), 826 - 828
5. Boyd, S.A., and Shelton, D.R.: Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984), 272 - 277

6. Boyd, S.A., Shelton, D.R., Berry, D., and Tiedje, J.M.: Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (1983), 50 - 54
7. Brunner, W., Sutherland, F.H., and Focht, D.D.: Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil by analog enrichment and bacterial inoculation. *J. Environ. Qual.* 14 (1985), 324 - 328
8. Chapman, P.J.: Bacterial metabolism of 4-chlorobenzoic acid. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 02 (1975), 192
9. Chatterjee, D.K., and Chakrabarty, A.M.: Genetic rearrangements in plasmids specifying total degradation of chlorinated benzoic acids. *Molec. Gen. Genet.* 188 (1982), 279 - 285
10. Chatterjee, D.K., Kellogg, S.T., Hamada, S., and Chakrabarty, A.M.: Plasmid specifying total degradation of 3-chlorobenzoate by a modified ortho pathway. *J. Bacteriol.* 146 (1981), 639 - 646
11. Chatterjee, D.K., Kilbane, J.J., and Chakrabarty, A.M.: Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in soil by a pure culture of Pseudomonas cepacia. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1982), 514 - 516
12. Crawford, R.L., and Mohn, W.W.: Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using a Flavobacterium. *Enzyme Microbiol. Technol.* 7 (1985), 617 - 620
13. De Bont, J.A.M., Vorage, M.J.A.W., Hartmans, S., van den Tweel, W.J.J.: Microbial degradation of 1,3-dichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (1986), 677 - 680
14. Dolfing, J., and Tiedje, J.M.: Hydrogen cycling in a three-tiered food web growing on the methanogenic conversion of 3-chlorobenzoate. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38 (1986), 293 - 298
15. Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W., and Knackmuss, H.-J.: Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. *Arch. Microbiol.* 99 (1974), 61 - 70
16. Dorn, E., and Knackmuss, H.-J.: Chemical structure and biodegradability of halogenated compounds. Two catechol 1,2-dioxygenase from a 3-chlorobenzoate-grown pseudomonad. *Biochem. J.* 174 (1978), 73 - 84

17. Dorn, E., and Knackmuss, H.-J.: Chemical structure and biodegradability of halogenated compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol. *Biochem. J.* 174 (1978), 85 - 94
18. Edgehill, R.U., and Finn, R.K.: Activated sludge treatment of synthetic wastewater containing pentachlorophenol. *Biotechnol. Bioeng.* 25 (1983), 2165 - 2176
19. Edgehill, R.U., and Finn, R.K.: Microbial treatment of soil to remove pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1983), 1122 - 1125
20. Engesser, K.-H., Schmidt, E., and Knackmuss, H.-J.: Adaptation of Alcaligenes eutrophus B9 and Pseudomonas sp. B13 to 2-fluorobenzoate as growth substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 (1980), 68 - 73
21. Evans, W.C., Smith, B.S.W., Fernley, H.N., and Davies, J.I.: Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Biochem. J.* 122 (1971), 543 - 551
22. Evans, W.C., Smith, B.S.W., Moss, P., and Fernley, H.N.: Bacterial metabolism of 4-chlorophenoxyacetate. *Biochem. J.* 122 (1971), 509 - 517
23. Focht, D.D., and Shelton, D.: Growth kinetics of Pseudomonas alcaligenes C-O relative to inoculation and 3-chlorobenzoate metabolism in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987), 1846 - 1849
24. Goldman, P., Milne, G.W.A., and Pignataro, M.T.: Fluorine containing metabolites formed from 2-fluorobenzoic acid by Pseudomonas species. *Arch. Biochem. Biophys.* 118 (1967), 178 - 184
25. Hartmann, J., Reineke, W., and Knackmuss, H.-J.: Metabolism of 3-chloro, 4-chloro-, and 3,5-dichlorobenzoate by a pseudomonad. *Appl. Environ. Microbiol.* 37 (1979), 421 - 428
26. Jeenes, D.J., Reineke, W., Knackmuss, H.-J., and Williams, P.A.: TOL plasmid pWWO in constructed halobenzoate-degrading Pseudomonas strains: Enzyme regulation and DNA structure. *J. Bacteriol.* 150 (1982), 180 - 187
27. Johnston, H.W., Briggs, G.G., and Alexander, M.: Metabolism of 3-chlorobenzoic acid a pseudomonad. *Soil Biol. Biochem.* 4 (1972), 187 - 190

28. Kilbane, J.J., Chatterjee, D.K., and Chakrabarty, A.M.: Detoxification of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid from contaminated soil by Pseudomonas cepacia. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1983), 1697 - 1700
29. Kilbane, J.J., Chatterjee, D.K., Karns, J.S., Kellogg, S.T., and Chakrabarty, A.M.: Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of Pseudomonas cepacia. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1982), 72 - 78
30. Klages, U., and Lingens, F.: Degradation of 4-chlorobenzoic acid by Nocardia species. *FEMS Microbiol. Lett.* 6 (1979), 201 - 203
31. Klages, U., and Lingens, F.: Degradation of 4-chlorobenzoic acid by a Pseudomonas sp. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C* 1 (1980), 215 - 223
32. Klages, U., Markus, A., and Lingens, F.: Degradation of 4-chlorophenylacetic acid by a Pseudomonas species. *J. Bacteriol.* 146 (1981), 64 - 68
33. Latorre, J., Reineke, W., and Knackmuss, H.-J.: Microbial metabolism of chloroanilines: Enhanced evolution by natural genetic exchange. *Arch. Microbiol.* 140 (1984), 159 - 165
34. Lehrbach, P.R., Zeyer, J., Reineke, W., Knackmuss, H.-J., and Timmis, K.N.: Enzyme recruitment in vitro: Use of cloned genes to extend the range of haloaromatics degraded by Pseudomonas sp. strain B13. *J. Bacteriol.* 158 (1984), 1025 - 1032
35. Liu, T., Chapman, P.J.: Degradation of halogenated aromatic acids and hydrocarbons by Pseudomonas putida. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* K211 (1983), 212
36. Marks, T.S., Smith, A.R.W., and Quirk, A.V.: Degradation of 4-chlorobenzoic acid by Arthrobacter sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984), 1020 - 1025
37. Marks, T.S., Wait, R., Smith, A.R.W., and Quirk, A.V.: The origin of oxygen incorporated during the dehalogenation/hydroxylation of 4-chlorobenzoate by an Arthrobacter sp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124 (1984), 669 - 674

38. Markus, A., Klages, U., Krauss, S., and Lingens, F.: Oxidation and dehalogenation of 4-chlorophenylacetate by a two-component enzyme system from Pseudomonas sp. strain CBS3. *J. Bacteriol.* 160 (1984), 618 - 621
39. Mikesell, M.D., and Boyd, S.A.: Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (1986), 861 - 865
40. Milne, G.W.A., Goldman, P., and Holtzman, J.L.: The metabolism of 2-fluorobenzoic acid. II. Studies with $^{18}\text{O}_2$. *J. Biol. Chem.* 243 (1968), 5374 - 5376
41. Müller, R., Thiele, J., Klages, U., and Lingens, F.: Incorporation of $[^{18}\text{O}]$ water into 4-hydroxybenzoic acid in the reaction of 4-chlorobenzoate dehalogenase from Pseudomonas spec. CBS3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124 (1984), 178 - 182
42. Oltmanns, R.H., Rast, H.G., and Reineke, W.: Degradation of 1,4-dichlorobenzene by enriched and constructed bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28 (1988), 609 - 616
43. Ramos, J.L., Stalz, A., Reineke, W., and Timmis, K.N.: Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986), 8467 - 8471
44. Reineke, W.: Construction of bacterial strains with novel degradative capabilities for chloroaromatics. *J. Basic Microbiol.* 26 (1986), 551 - 567
45. Reineke, W., Jeenes, D.J., Williams, P.A., and Knackmuss, H.-J.: TOL plasmid pWWO in constructed halobenzoate-degrading Pseudomonas strains: Prevention of meta pathway. *J. Bacteriol.* 150 (1982), 195 - 201
46. Reineke, W., and Knackmuss, H.-J.: Construction of haloaromatics utilising bacteria. *Nature (Lond)* 277 (1979), 385 - 386
47. Reineke, W., and Knackmuss, H.-J.: Hybrid pathway for chlorobenzoate metabolism in Pseudomonas sp. B13 derivatives. *J. Bacteriol.* 142 (1980), 467 - 473
48. Reineke, W., and Knackmuss, H.-J.: Microbial metabolism of haloaromatics: Isolation and properties of a chlorobenzene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984), 395 - 402

49. Reineke, W., Wessels, S.W., Rubio, M.A., Latorre, J., Schwien, U., Schmidt, E., Schrömann, M., and Knackmuss, H.-J.: Degradation of monochlorinated aromatics following transfer of genes encoding chlorocatechol catabolism. FEMS Microbiol. Lett. 14 (1982), 291 - 294
50. Ruisinger, S., Klages, U., and Lingens, F.: Abbau der 4-Chlorbenzoësäure durch eine Arthrobacter-Species. Arch. Microbiol. 110 (1976), 253 - 256
51. Schmidt, E., and Knackmuss, H.-J.: Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleoylacetic acid. Biochem. J. 192 (1980), 339 - 347
52. Schmidt, E., Bartels, I., and Knackmuss, H.-J.: Degradation of 3-chlorobenzoate by benzoate or 3-methylbenzoate-utilising cultures. FEMS Microbiol. Ecol. 31 (1985), 381 - 389
53. Schmidt, E., Hellwig, M., and Knackmuss, H.-J.: Degradation of chlorophenols by a defined mixed microbial community. Appl. Environ. Microbiol. 46 (1983), 1038 - 1044
54. Schmidt, E., Remberg, G., and Knackmuss, H.-J.: Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Halogenated muconic acids as intermediates. Biochem. J. 192 (1980), 331 - 337
55. Schraa, G., Boone, M.L., Jetten, M.S.M., van Neerven, A.R.W., Colberg, P.J., and Zehnder, A.J.B.: Degradation of 1,4-dichlorobenzene by Alcaligenes sp. strain A175. Appl. Environ. Microbiol. 52 (1986), 1374 - 1381
56. Schwien, U., Schmidt, E., Knackmuss, H.-J., and Reineke, W.: Degradation of chlorosubstituted aromatic compounds by Pseudomonas sp. strain B13: fate of 3,5-dichlorocatechol. Arch. Microbiol. 150 (1988), 78 - 84
57. Schwien, U., and Schmidt, E.: Improved degradation of monochlorophenols by a constructed strain. Appl. Environ. Microbiol. 44 (1982), 33 - 39
58. Sharpee, K.W., Duxbury, J.M., and Alexander, M.: 2,4-Dichlorophenoxyacetate metabolism by Arthrobacter sp.: Accumulation of a chlorobutenoide. Appl. Microbiol. 26 (1973), 445 - 447

59. Shelton, D.R., and Tiedje, J.M.: Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984), 840 - 848
60. Spain, J.C., and Nishino, S.F.: Degradation of 1,4-dichlorobenzene by a Pseudomonas sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987), 1010 - 1019
61. Steiert, J.G., and Crawford, R.L.: Catabolism of pentachlorophenol by a Flavobacterium sp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141 (1986), 825 - 830
62. Suflita, J.M., Horowitz, A., Shelton, D.R., and Tiedje, J.M.: Dehalogenation: A novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. *Science* 218 (1982), 1115 - 1117
63. Tiedje, J.M., and Alexander, M.: Enzymatic cleavage of the ether bond of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *J. Agric. Food Chem.* 17 (1969), 1080 - 1084
64. Tiedje, J.M., Duxbury, J.M., Alexander, M., and Dawson, J.E.: 2,4-D metabolism: Pathway of degradation of chlorocatechols by Arthrobacter sp. *J. Agric. Food Chem.* 17 (1969), 1021 - 1026
65. Tsuchiya, T., and Yamaha, T.: Reductive dechlorination of 1,2,4-Trichlorobenzene on incubation with intestinal contents of rats. *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)* 47 (1983), 1163 - 1165
66. Tsuchiya, T., and Yamaha, T.: Reductive dechlorination of 1,2,4-trichlorobenzene by Staphylococcus epidermidis isolated from intestinal contents of rats. *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)* 48 (1984), 1545 - 1550
67. Valo, R., and Salkinoja-Salonen, M.: Bioreclamation of chlorophenol-contaminated soil by composting. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25 (1986), 68 - 75
68. Van den Tweel, W.J.J., Ter Burg, N., Kok, J.B., and De Bont, J.A.M.: Bioformation of 4-hydroxybenzoate from 4-chlorobenzoate by Alcaligenes denitrificans NTB-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25 (1986), 289 - 294
69. Weisshaar, M.-P., Franklin, F.C.H., and Reineke, W.: Molecular cloning and expression of the 3-chlorobenzoate-degrading genes from Pseudomonas sp. strain B13. *J. Bacteriol.* 169 (1987), 394 - 402

70. Zaitsev, G.M., and Karasevich, Y.N.: Utilization of 4-chlorobenzoic acid by Arthrobacter globiformis. Mikrobiologiya 50 (1980), 35 - 40
71. Zaitsev, G.M., and Karasevich, Y.N.: Preparative metabolism of 4-chlorobenzoic acid in Arthrobacter globiformis. Mikrobiologiya 50 (1980), 423 - 428
72. Zaitsev, G.M., and Karasevich, Y.N.: Utilization of 2-chlorobenzoic acid by Pseudomonas cepacia. Mikrobiologiya 53 (1982), 75 - 80
73. Zeyer, J., and Kearney, P.C.: Microbial degradation of para-chloroaniline as sole carbon and nitrogen source. Pest. Biochem. Physiol. 17 (1982), 215 - 223
74. Zeyer, J., Wasserfallen, A., and Timmis, K.N.: Microbial mineralization of ring-substituted anilines through an ortho-cleavage pathway. Appl. Environ. Microbiol. 50 (1985), 447 - 453

Tab. 1: Dekontaminierung von Böden durch Spezialkulturen (Abk.: PCP, 2,4,5T, PCB und 3CB, Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlormethoxyacetat, Polychlorierte Biphenyle und 3-Chlorbenzoat

Substanz	Stamm	Bodendekontaminierung	Nachweis des Abbaus	Literatur
PCP	<u>Arthrobacter</u> sp.	Boden: 150-200 mg PCP/l Bodenwasser; Zusatz von 10^6 Zellen/g Boden; Halbwertszeit von 2 Wochen auf 15 h reduziert; Restkonzentration 10-30 mg PCP/l Bodenwasser.	Verschwinden von PCP	[19]
2,4,5T	<u>Pseudomonas cepacia</u> Stamm AC1100	Boden: 20 mg 2,4,5T/g Boden; Zusatz von 6×10^7 Zellen/g Boden; nach 6 Wochen verblieben 2 mg 2,4,5T/g Boden (nimmt Pflanzenwachstum); AC1100 Titer fällt innerhalb von 8 Wochen von 10^7 Zellen/g Boden unter die Nachweisgrenze bei Abwesenheit von 2,4,5T; erneuter Zusatz von 2,4,5T bewirkt einen raschen Anstieg des Titers von AC1100 nach einer 2-wöchigen Anlaufphase.	Verschwinden von 2,4,5T und Chloridfreisetzung	[11, 28, 39]
PCP	<u>Flavobacterium</u> sp.	Boden: 300 mg PCP/g Boden; Zusatz von 10^7 Zellen/g Boden; innerhalb 1 Woche 298 mg PCP/g auf 55 mg PCP/g Boden; Boden ohne Inokulum: kein Abbau; unter allen Bedingungen: Restkonzentration 10-50 mg/g Boden.	$^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung	[12, 61]

Fortsetzung Tab. 1

Substanz	Stamm	Bodendekontaminierung	Nachweis des Abbaus	Literatur
PCBs (Aroclor 1242)	<u>Acinetobacter</u> sp. Stamm P6	Boden: 100 µg/g Boden; Beiimpfung mit <u>Acinetobacter</u> (10^9 Zellen/g Boden) bewirkt keine beschleunigte Mineralisierung von ^{14}C -PCB; wurde hingegen dem Boden Biphenyl zugesetzt, so wurden 20 bis 27% der Markierung als $^{14}\text{CO}_2$ nachgewiesen, während über den Zeitraum von 63 Tagen in der Kontrolle ohne Zusatz von Biphe- nyl weniger als 1% mineralisiert wurde.	$^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung	[7]
PCP und chloronierte Phenol	<u>Rhodococcus</u> <u>chlorophenolicus</u>	kontaminiert Boden der Holz- schutzbearbeitung einer Säge- mühle; 5×10^6 abbauende Zellen/g Boden ohne Animpfen; 70 m Feldexperiment: Konzentration sank von 200 auf 15 µg PCP/g frischer Boden über 2 Sommer; Restkonzentration 10-30 µg PCP/g Boden.	Verschwinden von PCP	[67]
3CB	<u>Pseudomonas</u> <u>alcaligenes</u>	Boden: 100 µg 3CB /g Boden; Zusatz von 10^2 Zellen/g bewirkt Abbau, während kein Abbau ohne Animpfen des Bodens beobachtet wurde.	$^{14}\text{CO}_2$ Freisetzung Verschwinden von 3CB	[23]

Tab. 2: Abwasserreinigung mit Hilfe von Spezialkulturen (Abk.: PCP, 3CB, DOC, Pentachlorphenol, 3-Chlorbenzoat, dissolved organic carbon)

Substanz	Stamm	Abwasserreinigung	Nachweis des Abbaus	Literatur
PCP	<u>Arthrobacter</u> sp.	synthetisches Abwasser: 40 mg PCP/l; Klärschlamm: etwa 7 Tage Anpassung; Zusatz von 10% Impfgut von Arthrobacter; nur 1-2 Tage Anpassung, Restkonzentration 1 mg PCP/l.	Verschwinden von PCP	[18]
Mischung von Chlorphenolen	<u>Pseudomonas</u> sp. Stamm B13	synthetisches Abwasser mit Phenol, Aceton, Methanol, Propanol und einer Mischung von Monochlorphenolen; Stabilität der Mischkultur nur gewährleistet in Gegenwart von Stamm B13.	DOC	[51]
3CB	<u>Pseudomonas</u> sp. Stamm B13	Mineralmedium mit Benzoat und 3CB; niedriger DOC mit Stamm B13, die Kultur bleibt farblos; hoher DOC ohne Stamm B13, die Kultur wird schwarz.	DOC	[52]

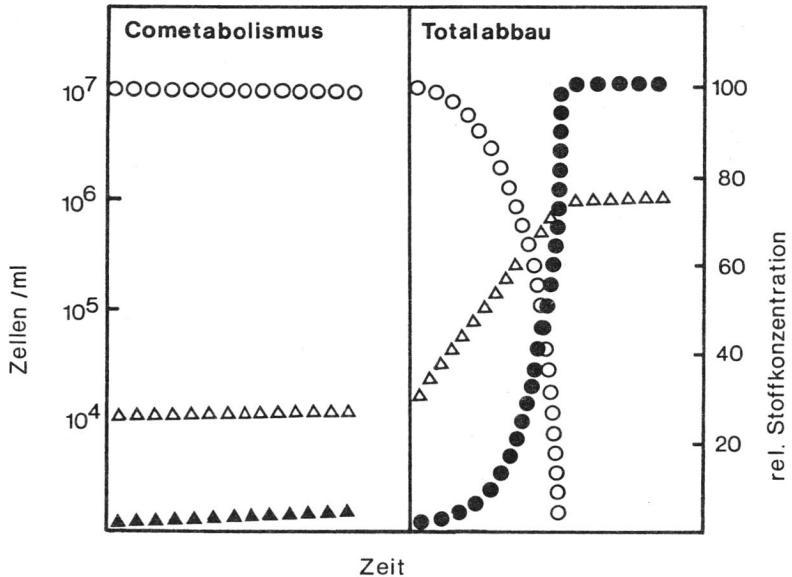


Abb. 1: Cometabolismus - Totalabbau
 (o) Chloraromat, (Δ) Mikroorganismen,
 (\blacktriangle) chlorhaltiger Metabolit und (\bullet) Chlorid

Literatur

Wachstumssubstrat

		Literatur
a)	3-Chlorbenzoat 4-Chlorbenzoat Pentachlorphenol	(27) (8, 30, 31, 36, 37, 41, 50, 68, 70, 71). (1)
b)	2-Chlorbenzoat 2-Fluorbenzoat 4-Chlorphenylacetat	(71) (20, 24, 40) (32, 38)
c)	3-Chlorbenzoat 3,5-Dichlorbenzoat 2-Chlorphenol 3-Chlorphenol 4-Chlorphenol Pentachlorphenol 1,2,4-Trichlorbenzol	(14, 59, 62) (62) (5, 6) (5, 6) (5, 6) (39) (65, 66)
d)	3-Chlorbenzoat 4-Chlorbenzoat 3,5-Dichlorbenzoat Chlorbenzol 1,3-Dichlorbenzol 1,4-Dichlorbenzol 2-Chloranilin 3-Chloranilin 4-Chloranilin 2-Chlorphenol 3-Chlorphenol 4-Chlorphenol 3-Chlorsalicylat 4-Chlorsalicylat 5-Chlorsalicylat 4-Chlorphenoxyacetat 2,4-Dichlorphenoxyacetat 4-Chlor-2-methylphenoxyacetat 3-Chlortoluol 4-Chlortoluol	(10, 15, 25) (9, 25, 47) (9, 25, 47) (35, 48, 69) (13, 42) (13, 42, 55, 60) (33) (33) (33, 73, 74) (57) (57) (57) (49) (49) (49) (22) (4, 21, 58, 63, 64) (3) (35) (35)

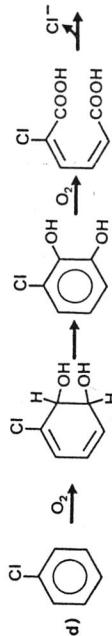
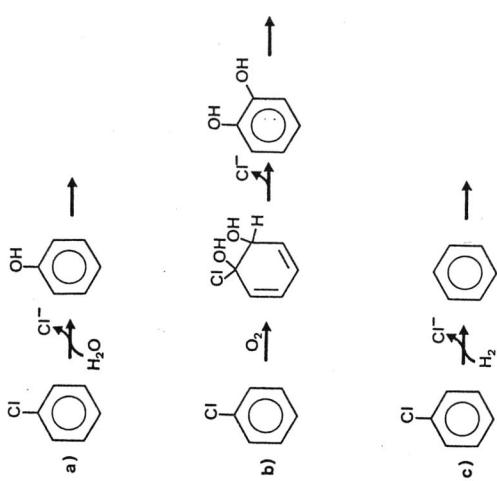


Abb. 2: Dehalogenierungen von Haloaromataten

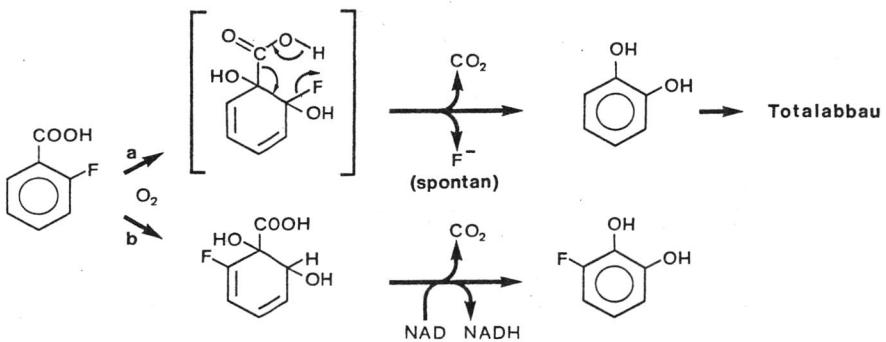


Abb. 3: Abbauwege für 2-Fluorbenzoat

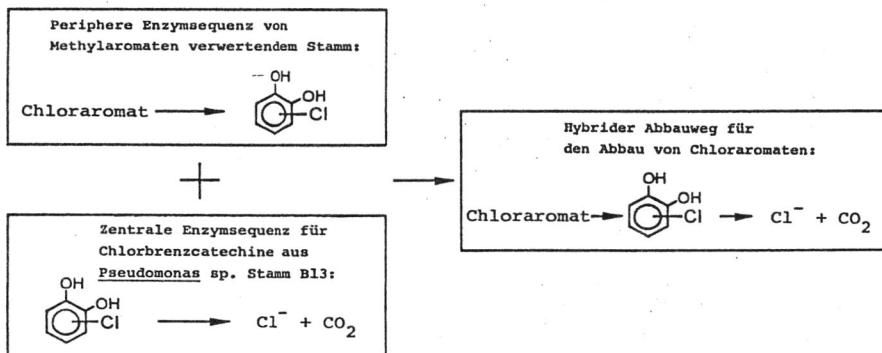


Abb. 4: Konzept für die Konstruktion von Bakterien für den Abbau von Haloaromaten

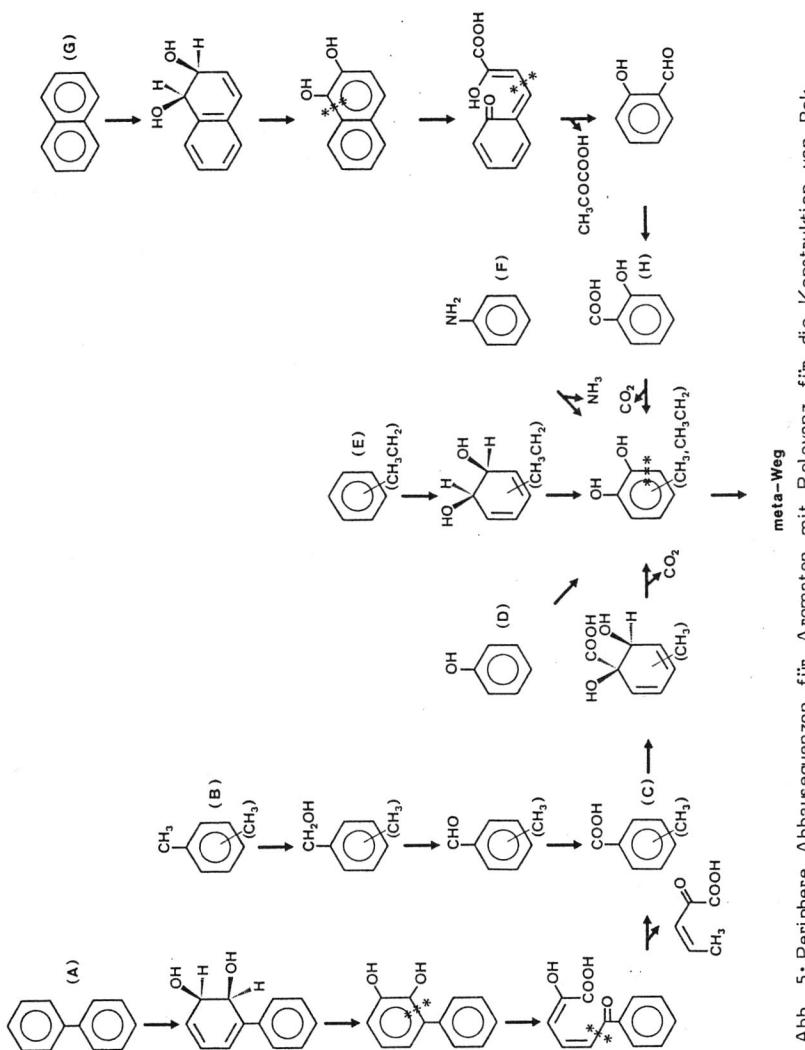
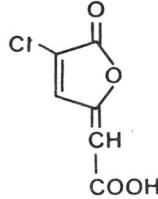
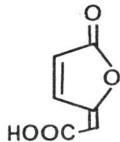
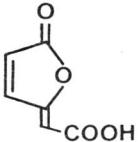
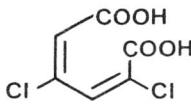
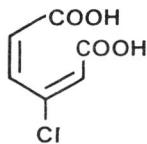
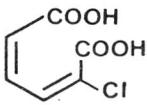
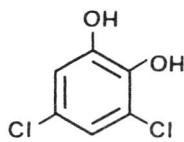
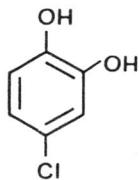
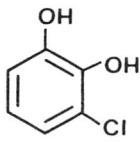


Abb. 5: Peripherie Abbausequenzen für Aromaten mit Relevanz für die Konstruktion von Bakterien für den Abbau von Halocarbenen
 (A) Biphenyl, (B) Toluol oder Xylole (CH_3CH_2), (C) Benzoat oder Toluate (CH_3CH_2),
 (D) Phenol, (E) Benzyl oder Ethylbenzol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), (F) Anilin, (G) Naphthalin und (H)
 Salicylat. Die zentralen Metabolite Brenzatechin, Methylbrenzatechin ($\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3$) oder
 Ethylbrenzatechin ($\text{CH}_2\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3$) werden nach meta-Spaltung über den meta-Weg abgebaut.
 Die Spaltung von C-C-Bindung ist durch Stern gekennzeichnet.



Totalabbau

Abb. 6: Abbausequenzen für chlorierte Brenzcatechine in Pseudomonas sp. Stamm B13

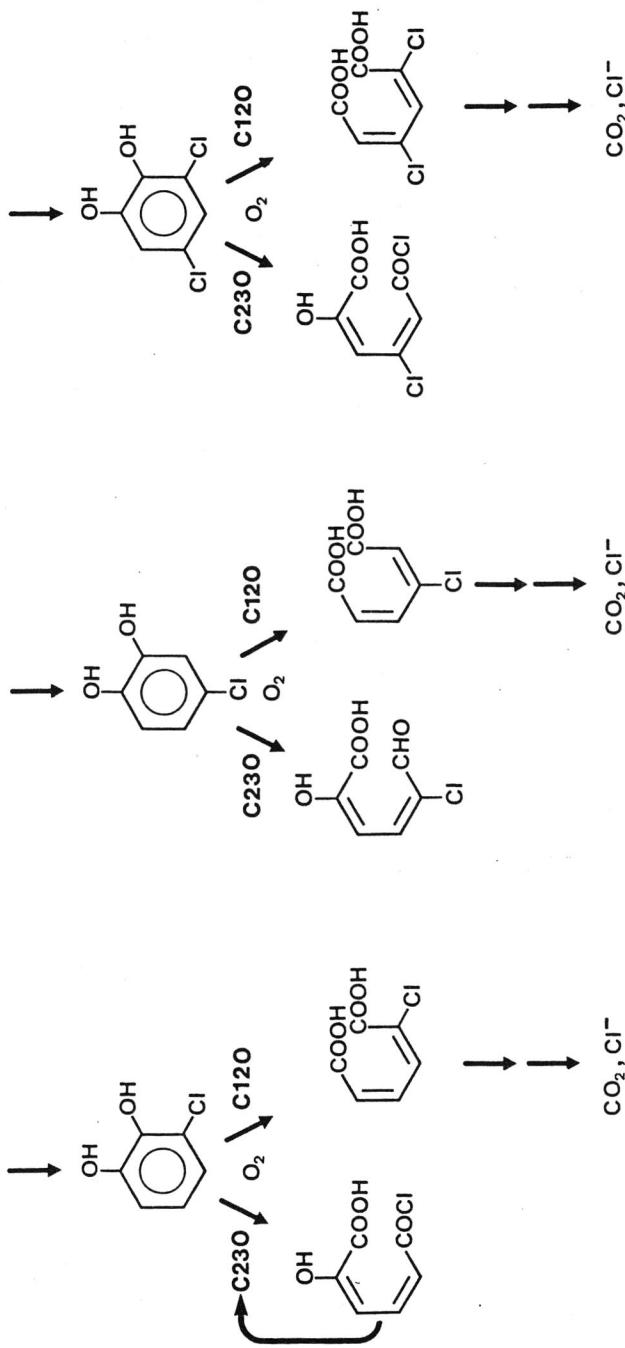


Abb. 7: Divergierende Abbauwege für chlorierte Brenzatechine in Hybridenstämmen

Laboratory Engineering of Bacteria Designed to Degrade Pollutants

K. N. Timmis, F. Rojo, J. L. Ramos, M. L. Krumme and D. F. Dwyer

INTRODUCTION

Enormous quantities of industrial chemicals have been released into the environment during the last few decades. A large number of them, particularly those structurally related to natural compounds, are readily degraded by soil and water microorganisms. However, a significant proportion, mainly those having novel structural elements or substituents rarely found in nature (xenobiotics), are only catabolised slowly and thus tend to persist and accumulate in the environment. Those compounds which exhibit some degree of toxicity may also contribute substantially to environmental pollution. Recent environmental catastrophes have underscored the acute danger that industrial chemicals constitute for our biosphere. However, the existence of waste dump sites containing highly toxic substances and large scale chronic pollution certainly represent more important long term hazards. Clearly, in addition to terminating or limiting current production of the more toxic and persistent industrial chemicals, it is also essential to exploit more effectively the biodegradative capacities of soil microorganisms in order to diminish the consequences of existing and continuing environmental pollution.

Fortunately, soil and water microorganisms collectively exhibit remarkable capacities to degrade a wide range of noxious chemicals [6] and to evolve degradative activities towards new compounds [14]. On the other hand, the evolutionary process can be extremely slow, particularly where the acquisition of multiple catalytic activities is necessary. In such cases, the evolution of new metabolic activities in the laboratory may be helpful [3, 4, 8, 13], because the frequency and type of genetic events needed (mutation; alteration of gene expression; gene transfer; etc.) can be carefully controlled and selective conditions optimized [16].

STRATEGIES FOR IN VITRO EVOLUTION OF CATABOLIC PATHWAYS

In general, the evolution of new metabolic potential involves the acquisition of new or modified enzymatic activities [2, 3, 17]. However, since the synthesis of many enzymes is carefully regulated and occurs only in response to the appearance of specific induction signals (e.g. the appearance in the medium of the cognate substrate of the enzyme or pathway), the acquisition of new specificities of regulators of gene expression is also important [3, 16, 17]. De novo evolution of a protein with a radically new activity often involves a number of genetic events (mutations, recombinations, fusions, etc.), most of which cannot be predicted *a priori*. Thus, laboratory (and natural) evolution of new phenotypes will generally involve the acquisition of new enzymatic or regulator specificities (for substrates and effectors, respectively) through mutational alteration of existing proteins or through recruitment of new proteins from different organisms. The ability of enzymes and regulators to undergo a relaxation of their specificities without loss of function [3, 17] and the existence of enzymes exhibiting catalytic activities towards a broad range of structurally distinct substrate molecules [7, 11, 12, 27] is of critical importance to evolution.

Two general strategies involving genetic manipulation have been developed for the evolution of catabolic pathways for recalcitrant compounds [17]. If the chemical exhibits substantial structural analogy to compounds that are readily degraded, the initial strategy of choice is to identify the steps of the known pathway which are non-permissive for the chemical in question, and then to modify these such that they become permissive. This approach generally leads to an expansion of the substrate profile of the existing pathway. The expansion can be horizontal such that more analogues of a single class of compounds are metabolised as a result of the recruitment of isofunctional enzymes from other pathways [11; see below] or as a result of the mutational alteration of the substrate specificities of existing key enzymes [2, 3, 17]. Pathway expansion can also be vertical, such that the existing pathway is used as a base onto which is added additional enzymes that extend the pathway upwards [11, 22]. Alternatively, if an existing pathway for related compounds is not known, new pathways can be conceived and appropriate component enzymes and regulatory elements sought in soil bacteria [21]. Once the feasibility of a new route is established, the corresponding enzymes can be recruited by the cloning of their structural and regulatory genes and the combination of such genes in an appropriate host organism [23].

EXPANSION OF THE SUBSTRATE RANGE OF A PATHWAY BY RECRUITMENT OF ENZYMES EXHIBITING RELAXED SPECIFICITIES

Horizontal expansion of catabolic pathways

The basis of horizontal expansion of catabolic pathways lies in the existence of isofunctional routes for degradation of structurally related compounds, the existence of enzymes having relaxed substrate specificities in some routes, and the ability to alter the specificity of proteins for their substrates/effectors by mutagenesis.

Pseudomonas putida bacteria containing TOL plasmid pWWO are able to degrade and grow on benzoate and a variety of alkylbenzoates such as 3- and 4-methylbenzoate, 3,4-dimethylbenzoate and 3-ethylbenzoate [24]. The TOL plasmid-specified catabolic pathway involves dioxygenation of the ring, followed by decarboxylation to yield alkylcatechols, which are then subjected to meta cleavage, and further oxidation to Krebs' cycle intermediates (Fig. 1). The genes of the pathway form an operon, the transcription of which originates from the promoter P_m which is positively controlled by a regulatory protein encoded by the xylS gene [7].

Pseudomonas sp. B13 is able to degrade 3-chlorobenzoate (3CB) via 3-chlorocatechol followed by ortho cleavage of the aromatic ring [5] (Fig. 1). It is not, however, able to degrade analogues of 3CB, such as 4-chlorobenzoate (4CB) or 3,5-dichlorobenzoate (35DCB), due to the narrow substrate specificity of the first enzyme of the pathway, benzoate 1,2-dioxygenase [20]. The substrate specificity of the isofunctional enzyme toluate 1,2-dioxygenase, specified by the TOL plasmid, is more relaxed and includes not only alkylbenzoates but also the chlorobenzoates 3CB, 4CB and 35DCB [19, 27]. It was therefore anticipated that recruitment of this enzyme into strain B13 would allow the bacterium to degrade not only 3CB but also its analogues. A DNA segment carrying the genes of toluate dioxygenase (xylD) and the following enzyme of the pathway, dihydroxycyclohexadiene carboxylate (benzoate cis-diol) dehydrogenase (xylL), plus the promoter P_m and the xylS gene, were cloned into a broad host range plasmid vector and introduced into the B13 strain [11]. As predicted, the B13 derivative thereby constructed could grow on 3CB and 4CB (Fig. 1), and synthesis of all catabolic enzymes involved in the metabolism of these substrates was fully regulated. On the other hand, the B13 derivative did not grow on 35DCB, even though the catabolic enzymes present in 4CB-grown bacteria are able to degrade this compound [20].

Vertical evolution of catabolic pathways

Central pathways, such as the chlorocatechol ortho cleavage pathway of B13 (Fig. 1), can be used as a base upon which to assemble additional enzymatic steps in order to permit the catabolism of more complex compounds. A

simple example of vertical expansion of the chlorocatechol pathway of *Pseudomonas* sp. B13 was provided by construction of a derivative able to degrade chlorosalicylates [11]. B13 is not able to degrade either salicylate or chlorosalicylates and bacteria able to catabolise chlorosalicylates are not readily isolated from soil. Plasmid NAH7 of *P. putida* specifies a pathway for the catabolism of naphthalene via salicylate and catechol [25]. The salicylate hydroxylase encoded by the NAH7 plasmid exhibits a relaxed substrate specificity and oxidizes salicylate and methyl- and chlorosalicylates to the corresponding catechols [11]. A DNA fragment of the NAH7 plasmid containing the gene encoding salicylate hydroxylase, plus the promoter of this gene, and the gene of the positive regulator of this promoter [26], was cloned into a wide host range vector and the hybrid plasmid introduced into *Pseudomonas* sp. B13, which thereby acquired the ability to grow on 3-, 4-, and 5-chlorosalicylates [11] (Fig. 1). Thus, recruitment of the NAH7 plasmid-encoded salicylate hydroxylase into a bacterium able to degrade chlorocatechols extended vertically the chlorocatechol degradation pathway and resulted in the construction of an organism able to catabolise compounds not readily degraded by soil isolates.

RATIONAL RESTRUCTURING OF CATABOLIC PATHWAYS BY SEQUENTIAL MODIFICATION

Pseudomonas putida bacteria containing TOL plasmid pWWO are able to grow on a variety of alkylbenzoates, including 3- and 4-methylbenzoate and 3-ethylbenzoate, but not 4-ethylbenzoate (Fig. 2). Other bacteria able to degrade methylbenzoates are readily isolated from soil but they also cannot generally degrade 4EB [17]. 4EB thus seems inherently more resistant to microbial attack than other alkylbenzoates. Biochemical and genetical studies were carried out to identify the steps in the TOL pathway which are non-permissive for 4EB. Firstly, an analysis of the inducer specificity of the *xylS* protein revealed that it is activated by 3- and 4- methyl-, 3,4-dimethyl- and 3-ethylbenzoate, but not 4EB [17] (Table 1). Thus, 4EB does not induce synthesis of the catabolic enzymes (Fig. 2). *xylS* regulator mutants which are activated by 4EB were selected. One such mutant *xylS* gene was then transferred into *P. putida* bacteria carrying the TOL plasmid. This derivative also failed to grow on 4EB but did degrade the compound to 4-ethylcatechol (Fig. 2). Thus, the catabolic enzymes are synthesized in this derivative, and 4EB is transformed to 4-ethylcatechol, but the meta-cleavage enzyme does not permit further metabolism. Characterization of the meta-cleavage enzyme, catechol 2,3-dioxygenase, revealed that 4-ethylcatechol is in fact a suicide substrate which causes irreversible inactivation of the enzyme.

It was reasoned that if a single amino acid change in the catechol dioxygenase could render it resistant to inactivation by 4-ethylcatechol, and that if this were the only further change needed to permit the complete degradation of 4EB via the TOL plasmid-encoded pathway, then the appropriate catechol dioxygenase mutants might be obtained by selecting directly for growth of bacteria on 4EB. A large number of *P. putida* bacteria carrying the TOL plasmid and the mutant *xylS* gene were plated on minimal medium containing the mutagen ethylmethane sulphonate and 4EB as the sole source of carbon and energy. Several colonies grew up under these conditions and all were subsequently shown to be able to metabolise 4EB, to use it as a source of carbon and energy, and to produce altered catechol dioxygenases that exhibited increased resistance to inactivation by 4-ethylcatechol [17]. The TOL plasmid-encoded pathway for the degradation of alkylbenzoates was thereby rationally restructured by sequential modification to enable it to process 4EB, by selective mutational alteration of two elements, which relaxed the effector specificity of the *xylS* protein, and increased the resistance of catechol 2,3-dioxygenase to inactivation by 4-ethylcatechol.

DESIGNING NEW CATABOLIC PATHWAYS: PATCHWORK ASSEMBLY OF ENZYMES AND REGULATORY SYSTEMS

Although the rational redesigning of an existing pathway is a relatively straightforward experimental approach to evolve a pathway for the degradation of a recalcitrant compound, it will not always suffice. In this case it may be appropriate to construct a new pathway by rationally combining patchwork fashion a series of catalytic activities derived from different pathways and different organisms.

Individual substituted phenols and benzoates have a significant level of toxicity but nevertheless can generally be degraded via catechol by microorganisms in soil and waste water treatment plants. Industrial wastes, however, frequently contain mixtures of chloro- and methyl-substituted phenols and benzoates and such mixtures are not only difficult to degrade but also tend to destabilize phenol- and benzoate-degrading microbial communities. The problem lies in the existence of both ortho and meta cleavage routes for degradation of catechols. Catechol and chlorocatechols are generally subjected to ortho fission whereas methylcatechols suffer meta fission. Although both pathways may exist in individual microorganisms, only one is usually functional at any given moment, according to the substrate which is available. However, when both chloro and methylcatechols are formed from mixtures of chloro and methylaromatics, both types of pathways are functional, often in the same organism, and the catechols will be subjected to both types of cleavage.

Whereas the ortho cleavage of chlorocatechols leads to their productive metabolism, ortho cleavage of methylcatechols leads to the formation of dead end products. Similarly, whereas the meta cleavage of methylcatechols leads to their productive metabolism, the meta cleavage of chlorocatechols leads to the formation of either dead end products, or to products that inactivate C230, the ring cleavage enzyme [10, 22]. The non-productive routing of catechol cleavage products during simultaneous metabolism of chloro- and methyl-substituted aromatics eventually perturbs the productive metabolism of aromatics by the cell or the community to such an extent that the community is destroyed [10].

One potential solution to this problem is the construction of catabolic routes for chloro- and methylaromatics that employ only one type of catechol ring fission mode. *Pseudomonas* sp. B13 possesses only ortho cleavage routes for catechols; it can grow on 3CB and acquires the ability to grow on 4CB when it receives the xylDLS genes from the TOL plasmid [11, 20]. In order to create a stable B13 derivative able to degrade 4CB, the cloned TOL genes were inserted into transposon Tn5 and the hybrid element was subsequently transposed into the B13 chromosome. The derivative thereby obtained, FR1 (Fig. 3), grew on 3CB and 4CB but not on 3MB or 4MB. The latter two compounds were, however, co-metabolized via ortho cleavage to the dead-end products 2- and 4-methyl-2-enelactone, respectively [10, 22] (Fig. 3). In order to effect mineralization of the dead-end product of ortho cleavage of 3MB and 4MB it was necessary to identify and recruit additional enzymes. The methyl-2-enelactones accumulated during metabolism of methylbenzoates were therefore isolated and used to select organisms able to use such compounds for growth. This resulted in the isolation of an *Alcaligenes* sp. able to grow on 2- and 4-methyl-2-enelactone [15]. Growth on 4-methyl-2-enelactone involves isomerization of 4-methyl-2-enelactone to 3-methyl-2-enelactone. Since *Pseudomonas* sp. B13 is able to grow on 3-methyl-2-enelactone, it was reasoned that recruitment of the isomerase function of the *Alcaligenes* sp. into FR1 would allow it to grow on 4MB. An *Alcaligenes* gene bank was therefore prepared in a wide host range mobilizable cosmid vector and mass transferred into FR1 by conjugation. Transconjugants able to grow on 4MB were readily isolated; the hybrid cosmid present in one of these was designated pFRC20P [21] (Fig. 3). Cell free extracts of these derivatives exhibited enzymatic activities that converted purified 4-methyl-2-enelactone to 3-methyl-2-enelactone. High levels of activity were measured both in 4MB-grown cells and in acetate-grown cells, although highest levels were obtained in 4MB-grown cells. This indicates that expression of the isomerase is regulated in these constructions, but that the basal level of synthesis is high.

Pseudomonas sp. B13 is able to grow on phenol and, after adaptation, 4-chlorophenol as sole sources of carbon and energy; catabolism is via an ortho-cleavage route, with catechol or 4-chlorocatechol as intermediates [9]. The

phenol hydroxylase involved also transforms 3- and 4-methylphenols (3MP, 4MP, respectively) in cell free extracts, and produces from substrates the corresponding methylcatechols [9]. In principle, therefore, a derivative of B13, such as FR1 (pFRC20P), which can mineralize 4-methylcatechol possesses all of the enzymes necessary to grow on 4MP as sole source of carbon and energy. However, although phenol is a growth substrate for this derivative, 4MP is not [21]. Spontaneous mutants could nevertheless be selected that grow on 4MP (frequency 10^{-7} - 10^{-8}). Measurement of phenol hydroxylase levels in such mutant bacteria grown either in succinate, phenol or 4MP revealed little or no enzyme in succinate-grown cells, and high activities in bacteria grown on phenol or 4MP. Synthesis of this enzyme is therefore specifically regulated.

The addition of a chloroaromatic such as 3CB to bacteria such as *P. putida* KT2440 (TOL) or *Pseudomonas* sp. B13 (TOL), which are actively degrading a methylbenzoate through a meta ring-fission pathway, resulted in inhibition of cell growth as a result of misrouting of 3CB into the meta pathway and irreversible inactivation of the key enzyme of the pathway, catechol-2,3-dioxygenase [1], by the ring fission product of 3-chlorocatechol, which is a highly reactive acylhalide. Addition of 4CB to such cells had a less severe impact on growth because the dead-end product, which forms as a result of misrouting of 4CB into the meta pathway, is less reactive. Addition of 3CB or 4CB to FR1 (pFRC20P) bacteria growing on 4MB had no inhibitory effect, and in fact promoted further growth of the cultures. Moreover, the B13 derivative degraded simultaneously the chloro- and methylbenzoates in the mixtures of 4MB + 4CB and 4MB + 3CB.

Thus, a novel ortho-cleavage pathway for the degradation of 4-methylbenzoate was constructed by the patchwork assembly of four pathway segments, namely

- a) the TOL plasmid toluate dioxygenase and following cis-diol dehydrogenase, which transform methylbenzoates to methylcatechols,
- b) the B13 chlorocatechol dioxygenase and chloromuconate cycloisomerase, which convert methylbenzoates to methyl-2-enelactones,
- c) the *Alcaligenes eutrophus* 4-methyl-2-enelactone isomerase, which converts 4-methyl-2-enelactone to 3-methyl-2-enelactone, and
- d) the B13 3-methyl-2-enelactone pathway, which completes the catabolic route. This pathway was further expanded through activation of the synthesis of a relaxed substrate specificity phenol hydroxylase.

The newly-evolved strain metabolizes chloro- and methyl-substituted phenols and benzoates exclusively via ortho cleavage routes, tolerates shock loads of one type of substituted benzoate or phenol while utilising the other as a carbon source, and degrades both types simultaneously when present together [21].

CONCLUDING REMARKS

Current levels of environmental pollution urgently require, among other measures, much greater exploitation of microbial degradative activities. Unfortunately, some chemicals possess structural elements or substituents that confer upon the molecule a high degree of resistance to enzymatic attack, or are present in mixtures that are incompatible for the effective degradation of the toxic component [23]. Soil microorganisms have the capacity to evolve enzymes able to attack most chemical groups but the evolution of catabolic pathways proceeds very slowly where multiple genetic changes are required, and where the selection pressures may only be effective in selecting the last genetic change to occur.

A major advantage of experimental evolution of pathways is that laboratory selection conditions, for example antibiotic treatment when selecting acquisition of a hybrid plasmid containing the gene of an enzyme to be recruited (or a mutant regulatory protein; see above), may be totally unrelated to the ultimate phenotypic change desired, for example catabolism of an aromatic. Thus, effective selection procedures can be custom designed for each of the individual genetic changes required [18]. Successive changes can either be effected in the organisms to be evolved, or can be effected in different organisms and subsequently combined sequentially or simultaneously in the chosen organism. In this way, the evolutionary process can be enormously accelerated. The cloning of genes of proteins having useful properties such as relaxed substrate specificities, for the purpose of genetic and functional analysis and for their transfer into organisms to be evolved, generates "evolutionary modules" for further experiments. Growth in the number of different modules available will increasingly facilitate the design and experimental evolution of new and more complex pathways.

The experiments described above, in which existing pathways have been restructured by enzyme recruitment through gene cloning or by mutational alteration of protein specificities, so that newly-acquired proteins recognise new substrates/inducers, or in which novel metabolic routes have been created by the patchwork assembly of enzymes and regulators from different pathways and from different organisms, confirm that experimental evolution of metabolic pathways is both feasible and holds considerable potential for accelerating the evolution of microbes that will be able to degrade particularly recalcitrant and toxic compounds.

Although we have focused largely on the manipulation of genes of enzymes and regulators, it is evident that other targets for experimental intervention will become relevant in the near future. The recruitment of appropriate membrane transport systems for unusual growth or transformation substrates may in some cases be important, as will be the isolation of mutants resistant to

the toxicity of certain compounds. In addition, however, there may be applications in which the efficacy of evolved activities can be considerably increased if the manipulated bacterium is able to undertake vectorial movement through fluid phases towards a non-diffusible or poorly diffusible target (e.g. plant root, hydrophobic chemical, etc.). Thus experimental manipulation of bacterial taxis and motility should receive increasing attention during the next few years.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the many discussions with our colleagues, H.J. Knackmuss and his group at the University of Stuttgart, and S. Harayama at the University of Geneva, and the excellent secretarial assistance of S. Ludwig. F.R. and J.L.R. were recipients of postdoctoral fellowships from the European Molecular Biology Organization and the Consejo Superior de Investigaciones Cientificas de Espana, respectively.

REFERENCES

1. Bartels, I., Knackmuss, H.-J., and Reineke, W.: Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984), 500 - 505
2. Campbell, J.H., Lengyel, J.A., and Langridge, J.: Evolution of second gene for β -galactosidase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Sci. USA* 70 (1973), 1841 - 1845
3. Clarke, P.H.: Experiments in microbial evolution. In: *The Bacteria*, L.N. Ornston and J.R. Sokatch, eds. Vol. 4, Academic Press, N.Y. (1978), 137 - 218
4. Cocks, G.T., Aguilar, J., and Lin, E.C.C.: Evolution of L-1,2-propanediol catabolism in *Escherichia coli* by recruitment of enzymes for L-glucose and L-lactate metabolism. *J. Bacteriol.* 118 (1974), 83 - 88
5. Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W., and Knackmuss, H.-J.: Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading *Pseudomonad*. *Arch. Microbiol.* 99 (1974), 61 - 70
6. Gibson, D.T.: *Microbial Degradation of Organic Compounds*. Microbiology Series Vol. 13, Marcel Dekker Inc. (1984)

7. Harayama, S., Leppik, R.A., Rekik, M., Mermod, N., Lehrbach, P.R., and Timmis, K.N.: Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzylalcohol by the *xylA* product. *J. Bacteriol.* 167 (1986), 455 - 461
8. Harayama, S., Ramos, J.L., and Timmis, K.N.: Experimental evolution of plasmid specified functions. In: *Antibiotic Resistance Genes: Ecology, Transfer and Expression*; Banbury Report 24, S.B. Levy and R.P. Novick eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1986), 389 - 402
9. Knackmuss, H.-J., and Hellwig, M.: Utilization and cooxidation of chlorinated phenols by *Pseudomonas* sp. B13. *Arch. Microbiol.* 117 (1978), 1 - 7
10. Knackmuss, H.-J.: Xenobiotic degradation in industrial sewage: haloaromatics as target substrates. In: *Biotechnology, Biochemical Society Symposium No 48*. C.F. Phelps and P.H. Clarke eds. Biochemical Society, London (1983), 173 - 190
11. Lehrbach, P.R., Zeyer, J., Reineke, W., Knackmuss, H.-J., and Timmis, K.N.: Enzyme recruitment in vitro: use of cloned genes to extend the range of haloaromatics degraded by *Pseudomonas* sp. strain B 13. *J. Bacteriol.* 158 (1984), 1025 - 1032
12. Mermod, N., Harayama, S., and Timmis, K.N.: New route to bacterial production of indigo. *Biotechnology* 4 (1986), 321 - 324
13. Mortlock, R.P.: Metabolic acquisitions through laboratory selection. *Ann. Rev. Microbiol.* 36 (1982), 259 - 284
14. Pemberton, J.M., Corney, B., and Don, R.H.: Evolution and spread of pesticide degrading ability among soil microorganisms. In: *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*. K.N. Timmis and A. Puhler, eds. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, (1979), 287 - 299
15. Pieper, D.H., Engesser, K.H., Don, R.H., Timmis, K.N., and Knackmuss, H.-J.: Modified ortho-cleavage pathway in *Alcaligenes eutrophus* JMP134 for the degradation of 4-methylcatechol. *FEMS Microbiol. Letters* 29 (1985), 63 - 67

16. Ramos, J.L., Stoltz, A., Reineke, W., and Timmis, K.N.: Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (1986), 8467 - 8471
17. Ramos, J.L., Wasserfallen, A., Rose, K., and Timmis, K.N.: Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science* 235 (1987), 593 - 596
18. Ramos, J.L., and Timmis, K.N.: Experimental evolution of catabolic pathways of bacteria. *Microbiol. Sci.* 4 (1987), 228 - 237
19. Reineke, W., and Knackmuss, H.-J.: Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2 dioxygenation of benzoic acid. *Biochem. Biophys. Acta* 542 (1978), 312 - 423
20. Reineke, W., and Knackmuss, H.-J.: Construction of haloaromatics utilizing bacteria. *Nature* 277 (1979), 385 - 386
21. Rojo, F., Pieper, D.H., Engesser, K.H., Knackmuss, H.-J., and Timmis, K.N.: Assemblage of ortho-cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science* 235 (1987), 1395 - 1398
22. Schmidt, E., Bartel, I., and Knackmuss, H.-J.: Degradation of 3-chlorobenzoate by benzoate or 3-methylbenzoate-utilizing cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31 (1985), 381 - 389
23. Timmis, K.N., Lehrbach, P.R., Harayama, S., Don, R.H., Mermod, N., Bas, S., Leppik, R., Weightman, A.J., Reineke, W., and Knackmuss, H.-J.: Analysis and manipulation of plasmid encoded pathways for catabolism of aromatic compounds by soil bacteria. In: *Plasmids in Bacteria*, D.R. Helinski, S.N. Cohen, D.B. Clewell, D.A. Jackson, and A. Hollaender eds., Plenum Publishing Corporation, (1985), 719 - 739
24. Worsey, M.J., and Williams, P.A.: Metabolism of toluene and the xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 124 (1975), 7 - 13
25. Yen, K.M., and Gunsalus, I.C.: Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), 874 - 878

26. Yen, K.M., and Gunsalus, I.C.: Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *J. Bacteriol.* 162 (1985), 1008 - 1013
27. Zeyer, J., Lehrbach, P.R., and Timmis, K.N.: Use of cloned genes of *Pseudomonas TOL* plasmid to effect biotransformation of benzoates to cis-dihydrodiols and catechols by *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1985), 1409 - 1413

Tab. 1: Activation of *xylS* and *xylS* mutant proteins by benzoate analogues

Benzoate analogue	Induction ratio (relative increase in β-galactosidase)		
	<i>xylS</i>	<i>xylS4</i>	<i>xylS352</i>
None	1	1	1
2MB	18	37	10
3MB	17	14	14
4MB	4	10	3
2,3MB	10	12	-
3,4MB	5	8	-
2,4MB	1	5	1
2,5MB	1	1	2
3,5MB	1	1	4
4EB	1	8	1
3,5CB	1	1	3

E.coli K-12 bacteria containing two plasmids, one carrying a *Pm:: lacZ* fusion and the other carrying either *xylS* or mutant *xylS* allele (*xylS4* or *xylS352*) were cultured in L-broth containing or lacking the benzoate analogue indicated in the left hand column. β-galactosidase levels were subsequently measured and the ratio: plus analogue / minus analogue (induction ratio) was determined. A value of 1 indicates that the analogue did not induce synthesis of β-galactosidase and thus does not serve as an effector of the *xylS* or mutant *xylS* proteins, whereas values greater than 1 indicate that the analogue served as an inducer. Abbreviations: B = benzoate; M = methyl; E = ethyl, C = chloro.

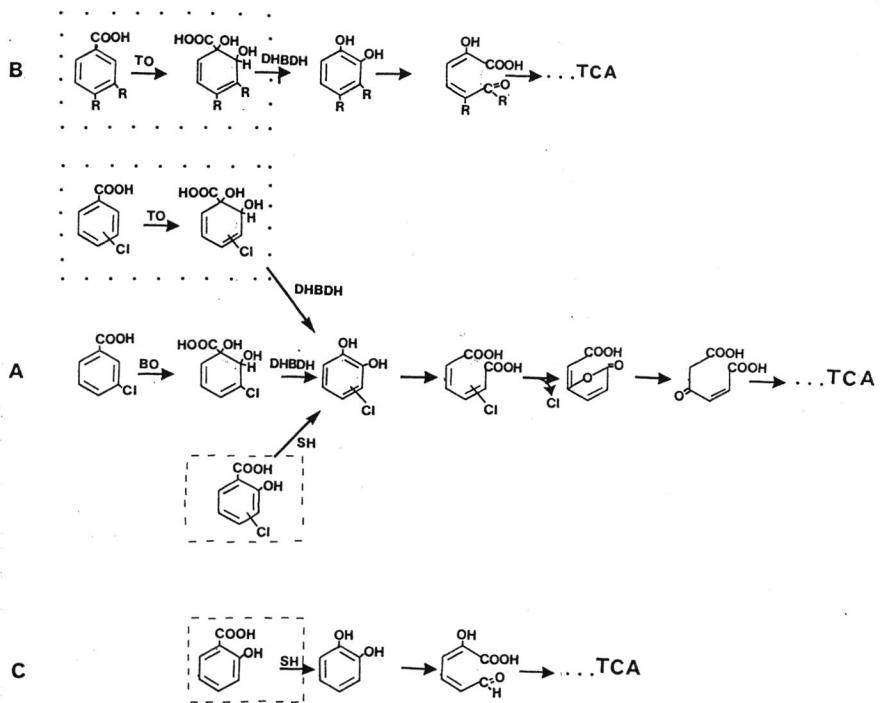


Fig. 1: Horizontal and vertical expansion of a catabolic pathway. The 3-chlorobenzoate catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. B13 (A) involves transformation of the substrate to 3-chlorocatechol, which is ortho cleaved, converted to 3-oxoadipate, and subsequently channelled into the TCA cycle. The first enzyme of the B13 pathway, benzoate 1,2-dioxygenase (BO), has a narrow substrate specificity and is able to transform 3-chlorobenzoate but not 4-chlorobenzoate or chlorosalicylates [20]. Recruitment of the genes coding for the relaxed substrate specificity enzyme toluate 1,2-dioxygenase (TO) and dihydroxycyclohexadiene carboxylate dehydrogenase (DHBDH) from the TOL plasmid meta-cleavage pathway (B), together with the promoter of these genes and the gene of the positive regulator of this promoter, allows B13 to degrade 4-chlorobenzoate [11]. Recruitment of the gene of the relaxed substrate specificity enzyme salicylate hydroxylase (SH) of the NAH7 plasmid-specified pathway for the degradation of salicylate (C) permits B13 to degrade and grow on 3-, 4- and 5-chlorosalicylate [11].

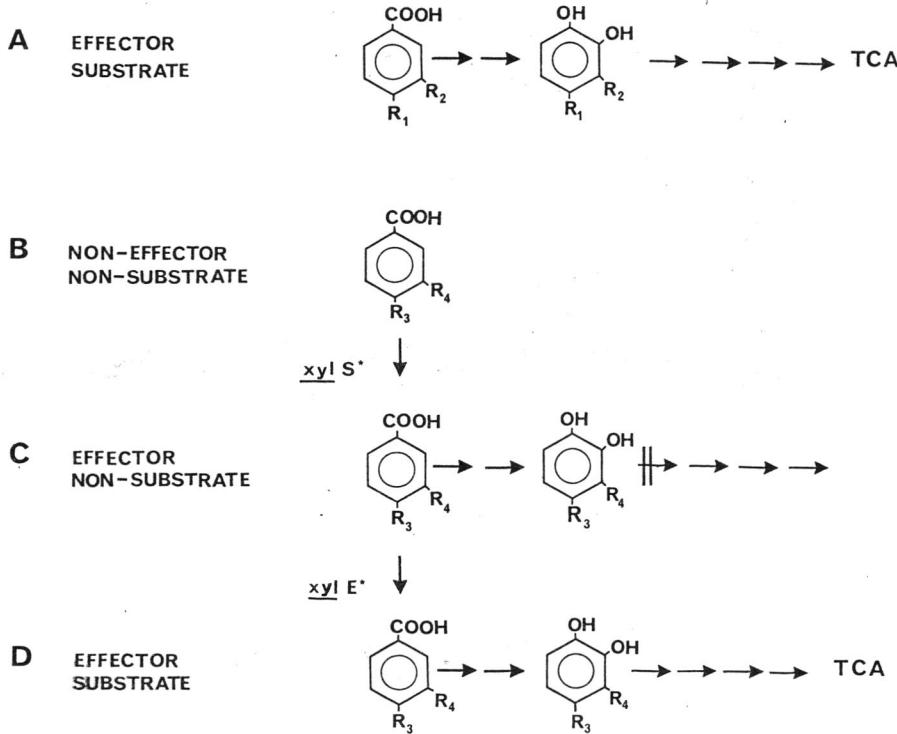


Fig. 2: Sequential restructuring of the TOL plasmid-specified meta cleavage pathway to enable catabolism of 4-ethylbenzoate. The pWWO plasmid-encoded meta-cleavage pathway can catabolise benzoate, 3- and 4-methylbenzoate, 3,4-dimethylbenzoate and 3-ethylbenzoate ($R_1 = H$ or CH_3 , $R_2 = H$, CH_3 or CH_2CH_3) (A), but not 4-ethylbenzoate (4EB, $R_3 = CH_2CH_3$; $R_4 = H$). The latter does not serve as an activator of the *xylS* protein regulator of the catabolic operon promoter *Pm* (Table 1) and thus fails to induce synthesis of the catabolic enzymes (B). Isolation of a mutant that produces a *xylS* protein analogue that is activated by 4EB results in the synthesis of all catabolic enzymes in response to the presence of 4EB in the bacterial culture medium (C). However, 4EB is only metabolised as far as 4-ethylcatechol because this intermediate inactivates the ring cleavage enzyme C230. The isolation of a mutant that produces a C230 analogue resistant to inactivation by 4-ethylcatechol eliminates the final metabolic block and permits complete degradation of 4EB through the meta pathway (D). TCA: tricarboxylic acid cycle.

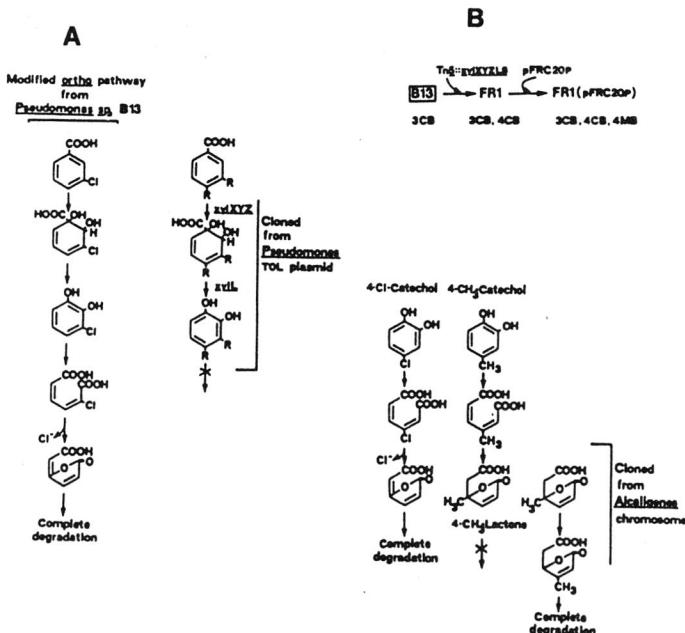


Fig. 3: Constructed hybrid pathway for the simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. A. The pathway. The route is based on the modified *ortho* pathway for 3-chlorobenzoate (3CB) of *Pseudomonas* sp. B13. Introduction into B13 of the TOL plasmid genes coding for toluate 1,2-dioxygenase (xyID) and dihydroxyxycyclohexadiene carboxylate dehydrogenase (xyII), together with that of the positive regulator of the xyID operon (xyIS), expands the degradation range to include 4-chlorobenzoate (4CB) and permits transformation of 4-methylbenzoate (4MB) to 4-methyl-2-enelactone which is accumulated as a dead end metabolite (strain FR1). Recruitment of a 4-methyl-2-enelactone isomerase from *Alcaligenes eutrophus* allows transformation of 4-methyl-2-enelactone to 3-methyl-2-enelactone (bottom right), which is degraded by other enzymes of B13 (strain FR1(pFRC20P)). Mutational modification of expression of the phenol hydroxylase of B13 further extends the degradation capacities to chloro- and methylphenols (strains FR1(pFRC20P)-1 and -2). The final route is thereby composed of 5 different pathway segments derived from 3 different organisms. B. The genetic steps leading to the formation of FR1(pFRC20P). Further abbreviations: 3MB, 3-methylbenzoate; 4CP, 4-chlorophenol; 4MP, 4-methylphenol (adapted from Rojo et al., Ref. 19).

Fate of Genetically-Engineered Bacteria in Activated Sludge Microcosms

D. F. Dwyer, S. W. Hooper, F. Rojo and K. N. Timmis

INTRODUCTION

A variety of classes of genetically engineered microorganisms (GEMs) have been developed for biotechnological processes. To perform their function these modified organisms need to be introduced into the environment in substantial numbers. Because of our limited knowledge concerning the interactions and roles of microorganisms in nature, this has elicited concern about potential risks for the environment. The majority of GEMs so far constructed do not constitute particularly novel genotypes, nor are they intended for introduction into ecological situations that are unusual for the parental organisms. Such GEMs do not therefore differ significantly from traditionally selected microbes with modified properties (e.g. nitrogen fixing, plant root nodulating bacteria such as Rhizobium) that have been introduced in substantial quantities into the environment for many years without any harmful effects being detected. Nevertheless, the large number of different GEMs currently under development for introduction into the environment, a few of which may constitute novel genotypes, makes it inappropriate to rely on past generalizations and requires that we investigate the fate and ecological consequences of such organisms once introduced into target ecosystems.

Laboratory microcosm studies in which the GEM is analyzed in contained conditions which simulate target ecosystems can be used to critically analyze those factors which not only relate to the GEM's effective functioning, but also relate to its ability to cause potentially harmful effects. These factors include:

- a) its ability to survive and multiply in the ecosystem into which it is introduced;
- b) the stability of its new genetic material and the potential of this material to transfer laterally to indigenous microorganisms;

- c) the ability of the GEM to carry out effectively the function for which it was designed under the conditions prevailing in the ecosystem;
- d) the effects, if any, of the GEM on the structure and function of the ecosystem into which it is introduced.

The most crucial property of a GEM which governs both its ability to function and to affect the environment is its ability to survive and multiply in the ecosystem into which it is introduced. As a general rule, microbes adapted to cultivation in the laboratory, by repeated passage in laboratory media, are not able to persist as well upon return to the natural environment. Similarly, organisms originating from an ecosystem (e.g. topsoil) different from the target ecosystem (e.g. groundwater) are less likely to persist in comparison to those originally derived from the target ecosystem. Thus, the behaviour of a GEM constructed by modification of an organism derived from the target ecosystem will be more predictable, and will probably be less likely to effect environmental changes than would a GEM constructed from an organism isolated from a different ecosystem.

To determine the fate of the GEM and of its new genetic information it is necessary to have good detection methods. Both the organism and the new genetic information must be tracked simultaneously and independently to assess possible loss of the new information from the GEM and its possible lateral transfer to indigenous microorganisms. Traditional methods for the detection and enumeration of specific microbes generally involve sample dilution and plating for single colonies on solidified selective media. The medium may be selective for a natural property of the organism or for a newly-acquired property (e.g. lactose utilization, resistance to nalidixic acid) that has been introduced specifically for the purpose of tracking the GEM and which differs from the introduced property that constitutes the crucial new functional aspect of the GEM. Exceptionally, this latter property may also serve as a basis for specific selection or detection of the GEM on solid media [11], thereby enabling both the organism and the newly-acquired genetic information to be independently tracked by plating techniques.

A GEM that alters the structure and/or function of an ecosystem into which it is introduced might do so either as a result of its activities unrelated to the genetic modification, an activity related to the genetic modification, or behaviour from interplay of the two. To predict the impact of a GEM upon a given ecosystem requires knowledge about the reciprocal effects of the GEM and its environment, and of the physical and biological parameters which control certain activities [10]. In certain cases it will be possible to assess direct competitive effects e.g., the exclusion of epiphytic bacteria by introduced *Ice⁻* mutants of Pseudomonas syringae [9]. In some cases, however, possible effects can only be detected indirectly by measurement of alterations in global ecosystem processes such as energy flow and nutrient cycling [7].

Model ecosystems and microcosms can be used to determine how well a GEM survives and functions and to determine any possible effects that the GEM may have on the ecosystem. Thus, a data base covering the interplay between GEMs and various types of model ecosystems would provide: (i) a predictive means for evaluating whether introduction of a given GEM into the environment would be accompanied by significant risk, (ii) guidelines for constructing GEMs to meet certain environmental standards for activity and survival, and (iii) methods for determining the fate of a GEM and of its modified genetic component(s) following environmental introduction [8].

The following describes experiments using a model activated sludge microcosm into which was introduced a GEM designed to function as a degrader of substituted-aromatic compounds which are environmental pollutants. These experiments were designed to provide information related to the above three points.

CONSTRUCTION OF GEMs

Xenobiotic pollutants have been and are still being released into our environment; many of these represent environmental hazards due to their toxicity [4]. The methods currently employed to dispose of these pollutants include the physical containment of affected material, chemical degradation and burning of the compounds. Biodegradation of pollutants by microorganisms offers an important alternative to these methods [6], especially since *in situ* degradation by introduced microorganisms is often the only foreseeable possibility for their detoxification. However, because many xenobiotic pollutants are recalcitrant to biodegradation, it is not always possible to isolate microorganisms which possess the catabolic ability to degrade these compounds. In many cases, though, individual bacteria contain the enzymatic capacity to catabolize some steps in a sequence leading to complete degradation. It may be possible to maintain these microbes in consortia to catabolize the pollutant [2,3], but the interdependent requirements of such associations may make it difficult to apply them to environmental sites, maintain survival of each member, and still obtain pollutant-degrading activity. Thus, it is of interest to combine these steps within one individual microorganism to create a GEM with a well-regulated catabolic pathway which can be applied to polluted areas to effect pollutant degradation.

For many microorganisms which degrade substituted aromatics, combinations of chloro- and methylaromatics lead to dead-end or even toxic intermediate formation [5] due to non-productive routing of substituted catechols into non-permissive ortho- and meta- cleavage routes of degradation. The presence of such mixtures as environmental pollutants has apparently not selected for microbes able to degrade these combinations by a single catabolic route. Thus, a GEM

was conceived so as to degrade chloro- and methylaromatics through one new pathway with enzymes obtained from three different microorganisms and reassembled in Pseudomonas sp. strain B13, which is able to use benzoate as a growth substrate, as follows: (i) cloning and insertion into the B13 chromosome of genes from the TOL plasmid which encode for the enzyme xyIXYZLS. This allowed B13 to degrade 4-chlorobenzoate (4CB) and to transform methylbenzoates to methylcatechols and then to methyl-2-enelactones (Pseudomonas sp. B13 strain FR1), and (ii) recruitment of a 4-methyl-2-enelactone isomerase from an Acaligenes strain to allow for transformation of 4-methyl-2-enelactone to 3-methyl-2-enelactone which is then further degraded by the original B13 enzymes which affect degradation of 3-chlorobenzoate (3CB) (Pseudomonas sp. B13 strain FR1(pFRC20P)). Except for one enzymatic step, the pathway of this GEM was fully regulated and the component enzymes were synthesized only in response to the presence of pathway substrates [11]. Thus, strain FR1 gained the ability to use 4CB as substrate and strain FR1(pFRC20P) gained the ability to simultaneously use 4-methylbenzoate (4MB) and 3CB as substrates by channelling both compounds through an ortho-cleavage route of degradation.

FATE AND FUNCTION OF BACTERIA STRAINS FR1 AND FR1(pFRC20P) IN AN ACTIVATED SLUDGE MICROCOISM

The microcosm experiments were designed to assess the fate of the parental Pseudomonas sp. strain B13 and its derivatives, strains FR1 and FR1(pFRC20P), their ability to function as degraders of substituted benzoates and the frequency of lateral transfer of novel genes from the GEMs to microorganisms indigenous to the microcosm. An activated sludge microcosm was chosen both for its complexity and because such an environment is appropriate to test the in situ ability of FR1 and FR1(pFRC20P) to degrade substituted aromatic compounds which are often present as chlorinated and methylated benzoates in effluents of treatment systems from wood-processing industries and chemical plants. The microcosm consisted of a 2.5 liter container to which was added 90 ml of a sterile synthetic sewage (Annon., OECD, 1971). An inoculum of 100 ml of activated sludge from a municipal sewage treatment plant was added and the microcosm allowed to equilibrate. The sludge was vigorously aerated to simulate activated digestion and to accomplish efficient mixing; a continuous flow system added sterile synthetic sewage at a dilution rate (D) of 0.5/hour. Substituted benzoates were added to the system through this inflow and liquid samples were taken to determine their concentration in the microcosm by analyses using a high pressure liquid chromatograph.

Survival of the GEMs upon addition to the microcosm was measured by direct counts using selective media containing antibiotics and the substituted benzoates as sole substrates: Pseudomonas sp. B13 was enumerated on plates

containing 3-chlorobenzoate (3CB); FR1 was enumerated on plates containing 4-chlorobenzoate (4CB) plus kanamycin (50 µg/ml); FR1(pFRC20P) was enumerated on plates containing 4-methylbenzoate (4MB) plus kanamycin (50 µg/ml); no background of bacteria from the microcosms grew on any of these plates. The effect on the ecosystem of the added substituted benzoates and of the added bacterial strains was assessed as the change in the total population of indigenous bacteria as enumerated on rich medium (AM3) and by microscopic observation. The ability of the GEMs to degrade the added benzoates was assessed by analysis of the concentration of the compounds present in the liquid medium of the microcosm.

The parental microorganism, Pseudomonas sp. B13, was able to survive in the microcosm at a level of approximately 1×10^5 bacteria/ml (Figure 1, panel A). No effect of addition of B13 was observed on the total population level of microorganisms. 4CB (1 mM) was added to the microcosm throughout the 14 day test period; 4CB was not degraded by strain B13, but a population of 4CB-degrading bacteria which were unable to degrade 4CB evolved within the microcosm in response to the presence of 4CB (data not shown). The population appeared on day 10 at 1×10^4 bacteria/ml and increased by day 14 to 5×10^5 bacteria/ml. The evolution of this bacterial population demonstrated the complexity of the ecosystem maintained within the microcosm and its ability to adapt to the presence of a new substrate.

The population of the derivative GEM, Pseudomonas sp. B13 strain FR1, demonstrated a survival pattern almost identical to that of the parental strain B13 (Figure 1, panels B and C). Thus, there appeared to be no adverse or promotional affect from genetic manipulation on the survival of the bacterium. FR1 was able to degrade 4CB (1 mM) added to the microcosm; no population of non-FR1-type 4CB-degraders developed in the system as compared to microcosms without addition of FR1 probably because FR1 was able to effectively eliminate 4CB.

The survival of the population of the other derivative GEM, strain FR1 (pFRC20P), was similar to that of both the parental strain and FR1 indicating that the presence of the plasmid pFRC20P did not adversely effect GEM survivability (Figure 2). FR1(pFRC20P) was able to degrade mixtures of 3CB and 4MB when added to the microcosm. Because the additive effect of substituted benzoates might be greater when the organism is already acclimated to growing on one of the substrates alone [4], the time of addition of the compounds was staggered. In Fig. 2, panel B, 4MB (1 mM) was added from the start of the experiment with 3CB (5 mM) added on day 3; in panel C the reverse was done with 3CB (1 mM) added from the start of the experiment and 4MB (5 mM) added on day 3. In both cases, the initial substrate was degraded, but the substrate added on day 3 was only degraded to about half of the added concentration (2.5 mM). The effect of the simulated shock load of 4MB in panel C was most adverse for the ecosystem; the total population of mi-

microorganisms decreased in number while that of the population of FR1(pFRC20P) increased until it represented fully 50% of the total population of recoverable microorganisms. An addition of simultaneous shock loads of 3CB and 4MB (5 mM each) on day 3 to an unacclimated system containing FR1(pFRC20P) severely affected both the total bacterial population and the population of the GEM. In this case (panel D) the GEM population never adequately recovered, while a new population of a 4MB degrader developed which could survive the conditions. This organism could degrade only 4MB and no degradation of 3CB occurred.

Preliminary evidence suggested that the plasmid pFRC20P was transferred into the indigenous microbial population based on the development of a large population of tetracycline-resistant microorganisms. This might explain the development of the 4MB-degrading population which arose as a result of the simultaneous addition of 4MB and 3CB to the microcosm (Figure 2, panel D) and which apparently was able to replace FR1(pFRC20P) as the dominant 4MB-degrading microbe in the microcosm.

SUMMARY

The conclusions that can be derived from this study regarding the fate of the GEMs and their ability to degrade added pollutants are as follows:

1. Both GEMs were able to survive in the microcosms. Because Pseudomonas sp. B13 has been cultured for a long time in the laboratory, it was not expected to survive well in the microcosm. Surprisingly, it and the derivative GEMs persisted at a high population level of approximately 10^5 bacteria/ml. Pure culture studies had demonstrated an ability of FR1(pFRC20P) to readily degrade simultaneous mixtures of 3CB and 4MB. In the microcosms, however, the GEM did not perform as well as expected, particularly when confronted with a shock load of a 3CB and 4MB mixture. Thus, the microcosm studies may be of potential help for making predictions concerning environmental applications of GEMs.
2. Pseudomonas sp. B13 derivative strains FR1 and FR1(pFRC20P) were able to degrade low concentrations of substituted benzoates within the complex ecosystem of the activated sludge microcosm. A good deal of information concerning the degradation pathway for aromatics by Pseudomonas sp. B13 was already known. This allowed for the construction of the stable, regulated pathways for the degradation of substituted aromatic compounds in both GEMs [11] and indicates that the construction of similar GEMs for the degradation of environmental pollutants is a promising experimental strategy.
3. There was not any demonstrable, adverse effect of GEM addition to the microbial population level in the microcosm. The GEMs were even able to function in a protective manner for the indigenous populations by buffering them

against the adverse effects of addition of substituted benzoates. In contrast, for microcosms lacking GEM addition, a wash-out of the bacterial population in the microcosm occurred (data not shown).

4. Lateral transfer of new genetic information (xylXYZLS) from the GEM chromosome to indigenous microorganisms was not detected, whereas transfer of the hybrid, mobilizable pFRC20P carrying the gene for lactone isomerase did apparently occur. In this particular case, transfer may have been beneficial for the community as a whole if it increased the ecosystem's ability to cope with the presence of toxic pollutants.

As more GEMs are constructed for specific biotechnological applications the diversity and complexity of microcosms used to study their fate and function will increase. The ability of such studies to predict *a priori* the fate of these microorganisms will help to develop strategies both to decrease the risks associated with introducing GEMs into the environment and to increase and regulate the capacity of GEMs to degrade toxic pollutants.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sandra Ludwig for excellent secretarial assistance.

REFERENCES

1. Dwyer, D.F., Rojo, F., and Timmis, K.N.: Bacteria with new pathways for the degradation of pollutants and their fate in model ecosystems. In: W. Klingmüller (ed.) Risk Assessment for Deliberate Releases. Springer-Verlag, Berlin, 1988
2. Grady, C.P.L., Jr.: Biodegradation. Its measurement and microbiological basis. *Biotech. Bioeng.* 27 (1985), 660 - 674
3. Hovarth, R.S.: Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacterial. Rev.* 36 (1972), 146 - 155
4. Keith, L.H., and Tellier, W.A.: Priority pollutants I-a perspective view. *Environ. Sci. Technol.* 13 (1979), 416 - 423
5. Knackmuss, H.-H.: Xenobiotic degradation in industrial sewage: haloaromatics as target substrates. In: C.F. Phelps & P.H. Clarke (eds.) *Biotechnology*. pp. 173 - 190, The Biochemical Society, London, 1983

6. Kobayashi, H., and Rittmann, B.E.: Microbial removal of hazardous organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 16 (1982), 170A - 181A
7. Levin, S.A., and Harwell, M.A.: Potential ecological consequences of genetically engineered organisms. *Environ. Managem.* 10 (1986), 495 - 513
8. Levine, M.M., Herrington, D., Morris, J.G., Lasonsky, G., Murphy, J., Tall, B., and Stocker, B.: Safety, inactivity, immunogenicity, and *in vivo* stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi* 541 Ty and 534 Ty, used as oral vaccines in man. *J. Clin. Invest.* 79 (1987), 888 - 902
9. Lindow, S.E.: Competitive exclusion of epiphytic bacteria by *Ice⁻ Pseudomonas syringae* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987), 2520 - 2527
10. Pritchard, P.H., O'Neill, E.J., Spain, C.M., and Ahearn, D.G.: Physical and biological parameters that determine the fate of p-chlorophenol in laboratory test systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987), 1833 - 1838
11. Rojo, F., Pieper, D.H., Engesser, K.-H., Knackmuss, H.-J., and Timmis, K.N.: Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science* 238 (1987), 1395 - 1397

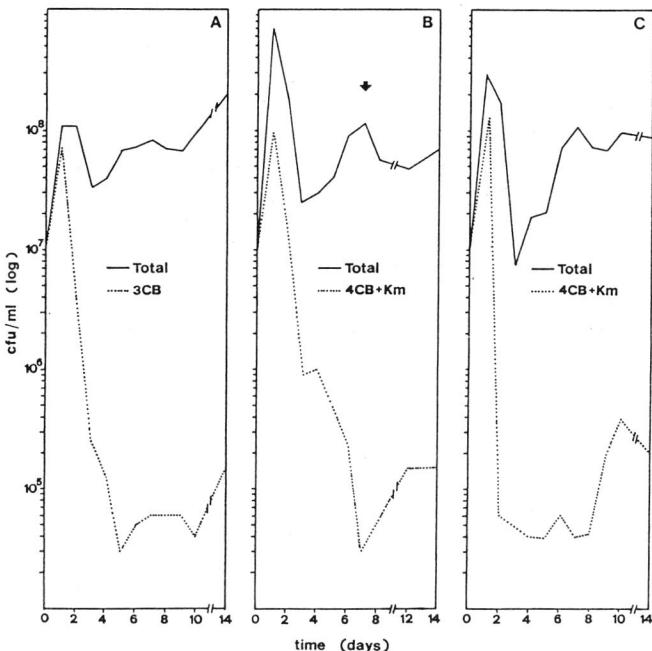


Fig. 1: Survival of *Pseudomonas* sp. strains B13 and FR1 in the activated sludge microcosms. (A) Microcosm with strain B13 plus 4CB (1 mM) added to the synthetic sewage. (B) Microcosm with strain FR1 plus 4CB (1 mM) added to the synthetic sewage from day 7 through 14. (C) Microcosm with strain FR1 plus 4CB (1 mM) added to the synthetic sewage from day 0 through 14. Enumeration of colony forming units (CFU) of bacteria was by plating for the total bacterial population (---) or by selective plating for B13 (---3CB) and FR1 (---4CB-Km). (Figure taken from Ref. 1).

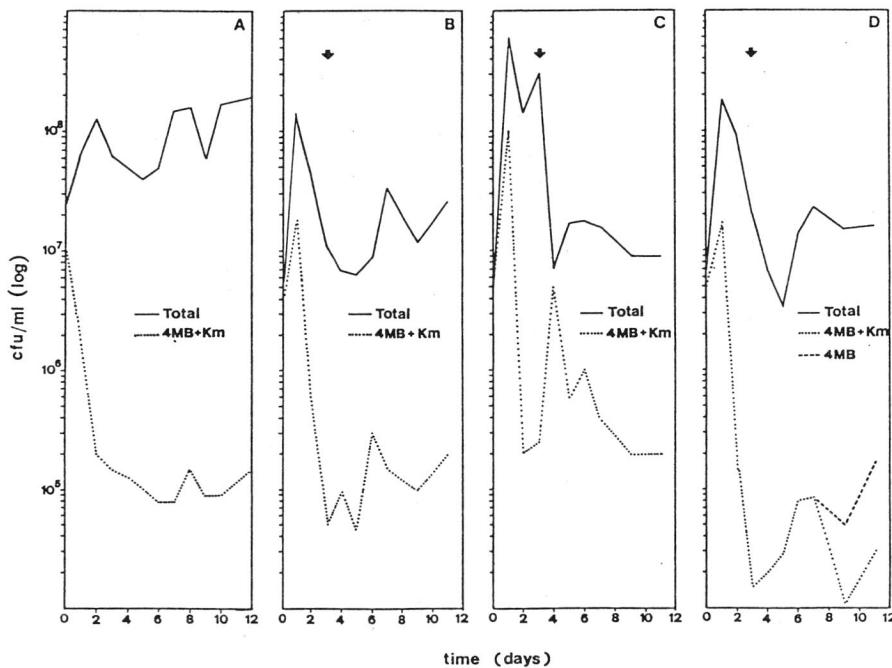


Fig. 2: Survival of *Pseudomonas* sp. strain FR1(pFRC2OP) in the activated sludge microcosms. (A) Microcosm with no addition of substituted benzoates. (B) Microcosm with 4MB (1 mM) added to the synthetic sewage from day 0 through 12 and 3CB (5 mM) from day 3 () through 12. (C) Microcosm with 3CB (1 mM) added from day 0 through 12 and 4MB (5 mM) from day 3 () through 12. (D) Microcosm with 3CB (5 mM) and 4MB (5 mM) added together from day 3 () through 12. Enumeration of colony forming units (CFU) of bacteria was by plating for the total bacterial population (---) or by selective plating for FR1 (pFRC2OP) (---4MB-Km) and indigenous 4MB-degrading bacteria (---). (Figure taken from Ref. 1).

Diskussion V

Seeber: Frage an Herrn Linton: Wie schätzen Sie die Relevanz von Genübertragungen für die Problematik einer Freisetzung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen ein?

Linton: Es ist ganz klar, daß Genübertragungen durch verschiedene Mechanismen stattfinden. Das Problem ist natürlich, eine Risikoanalyse durchzuführen, die sich mit allen Formen der Genübertragung beschäftigt. Die Risikoanalyse sollte sich nicht nur mit den Eigenschaften von gentechnisch veränderten Mikroorganismen (GEMs) sondern auch mit den Eigenschaften von Nicht-Zielorganismen beschäftigen, die diese Information bekommen haben. Natürlich sind die vorhersagbaren Möglichkeiten sehr gering, weil man gar nicht weiß, welche Organismen in Frage kommen, und deswegen werden jetzt sehr viele Anstrengungen unternommen, um die Transferrate zu verringern. Ein wichtiger Aspekt von heutigen Forschungen ist nicht nur, GEMs zu konstruieren, sondern auch Sicherheitsaspekte in GEMs genetisch einzubringen. Man muß also nicht nur ein GEM konstruieren, das z.B. eine Immunreaktion hervorruft, sondern man muß zur Sicherheit auch den Mikroorganismus verändern, damit der Gentransfer niedrig bleibt.

Klein: Die Frage der Übertragbarkeit von im Labor aktiven Mikroorganismen auf technologisch nutzbare Anlagen scheint besser lösbar und problemloser in den Griff zu kriegen, wenn wir die Mikroorganismen einsperren in organische Polymere. Man macht das bereits in der Fermentertechnik, und es gibt auch Ansätze dazu in der Trinkwasseraufbereitung in unseren Laboratorien. Wir haben also die Frage nach dem Freisetzungproblem dadurch gedämpft, daß wir die Freisetzung nicht als Ziel des Ganzen betrachten, also nicht in offenen Systemen arbeiten.

Reineke: Meine Antwort ist relativ kurz: Für die Ziele, die Sie angesprochen haben, kenne ich im Augenblick keine Beispiele. Aber es gibt Beispiele aus der Arbeitsgruppe von Herrn Rehm aus Münster, wo Mikroorganismen zum Chlorphenolabbau immobilisiert wurden; das funktionierte recht gut. Ein anderes Beispiel war der Abbau von DDT, wo durch das Immobilisieren gleichzeitig zwei Probleme bewältigt wurden: der aerobe und der anaerobe Abbau.

Seeber: Als Hygienikerin möchte ich hervorheben, daß die künftigen biologischen Kläranlagentechnologien beim Abbau von Schadstoffen aus Industrieeinrichtungen neben den primären Nutzungsaspekten auch für die aquatische Umweltverträglich sein müssen; nur dann dürfen Organismen in größerem Maßstab freigesetzt werden. Diese Forderung ist ein wichtiger Aspekt zur Gewährleistung der Umwelthygiene im aquatischen Bereich. Eine Frage an die Herren Reineke, Timmis und Dwyer: Welche Chancen sehen Sie in der näheren Zukunft, die fantastischen Möglichkeiten, die Sie uns gerade vorgeführt haben, anzuwenden?

Reineke: Ihre Frage ist wohl, ob man mit dem, was wir jetzt erreicht haben, in der Praxis irgendwas Vernünftiges machen kann. Ich glaube, das ist noch problematisch, denn in jeder Käranlage, in die wir Organismen bringen, die den Abbau gewährleisten, treten überwiegend Organismen auf, die Kometabolismus bewirken; daraus resultieren toxische Metabolite. Durch das direkte Zuimpfen in allgemeinen kommunalen Kläranlagen wird das Problem nicht bewältigt. Man sollte an industriellen Standorten möglichst schon vermeiden, daß alles zusammenfließt. Auch unsere Spezialisten werden mit der Vielfalt der Chemikalien, die die chemische Industrie in ihre großen, optimal funktionierenden Kläranlagen leitet, auch kaum fertig. Man muß also daran denken, spezielle Abwässer durch Fachleute direkt am Ort der speziellen Produktion zu eliminieren. Das ist natürlich eine teure Sache, aber es ist möglicherweise der einzige Weg, um zu umgehen, daß durch irgendeine neue Substanz die große Kläranlage in Schwierigkeiten kommt.

Frommer (Wuppertal): Ich möchte eine grundsätzliche Frage anschneiden. Was tun wir eigentlich bei der Gentechnologie? Lesen wir da durch Selektionsverfahren bestimmte, in der Natur vorhandene Eigenschaften aus, die Sonderleistungen vollbringen können? Was ist daran nun wirklich neuartig, und was hat die Natur nicht bereits gemacht? Diesen Fragen sollte man doch primär nachgehen.

Regelungen zur Freisetzung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen und Viren in den USA

G. Mahro

ZUSAMMENFASSUNG

Während die "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in-vitro neukombinierte Nukleinsäuren" des Bundesministers für Forschung und Technologie für die gentechnische Laborforschung ein differenziertes Gefüge von Risikobewertung und Sicherheitsmaßnahmen vorsehen, ist die Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen einem Verbot mit Erlaubnisvorbehalt unterworfen. Entscheidungskriterien über das Ausmaß und die Zumutbarkeit der mit der Freisetzung von sich selbstständig ausbreitenden "neuen" Organismen einhergehenden ökologischen und gesundheitlichen Risiken sind in der Bundesrepublik bislang nicht vorgegeben. Die Enquete-Kommission des Deutschen Bundestages "Chancen und Risiken der Gentechnologie" hat in ihrem Abschlußbericht vom Januar 1987 für Freisetzungen ein 5-jähriges Moratorium vorgeschlagen zwecks Entwicklung angemessener Folgenabschätzung und Sicherheitskonzepte.

In den Vereinigten Staaten wird die Freisetzung im Rahmen der "Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules" des National Institute of Health (NIH) für staatlich geförderte Projekte geregelt; allgemein verbindlich sind die Regelungen nach dem "Toxic Substances Control Act" (TSCA) und dem "Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act" (FIFRA) der Environmental Protection Agency (EPA). Alle diese Regelungsansätze basieren auf einer Risiko-Nutzen-Abwägung. Kernelemente sind:

- eine Anmelde- bzw. Genehmigungspflicht für alle Freisetzungen,
- ein gründlicher Review-Prozeß auf Einzelfallbasis und die
- Erfassung und Auswertung der Versuchsdaten zur Fundierung weiterer, zukünftiger Regelungen.

Zur Erfassung der spezifischen Risiken selbstständig vermehrbarer Risikoquellen hat EPA die sonst gültige Ausnahme von den Regelungstatbeständen des

TSCA und des FIFRA für small-scale-Forschung und Entwicklung bei gentechnisch manipulierten Organismen aufgehoben.

Unbeabsichtigte Freisetzungen und Freisetzungen im Rahmen von Entsorgung und Abfallbeseitigung können unter EPA's weitgehenden Kompetenzen aus Wasser-, Luft- und Abfallgesetzgebung kontrolliert bzw. eingeschränkt werden, sobald EPA betreffende Organismen-Gruppen in die Liste der zu regulierenden Substanzen aufnimmt.

Die nach dem "National Environmental Policy Act" zwingend vorgeschriebene Umweltverträglichkeitsprüfung bei umweltrelevantem Handeln staatlicher Organe enthält eine weitere wichtige Kontrollstation für die mit der Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen verbundenen Risiken, die neben einer umfassenden Risikoanalyse insbesondere auch zur Prüfung von Alternativen zu risikobehafteten Techniken verpflichtet.

1. EINLEITUNG

Rechtsfragen der Freisetzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen und Viren werden in USA wie in Europa in der Regel in Bezug auf geplante Freisetzungsversuche (deliberate release) erörtert. Neben diesen absichtlichen Freisetzungen bedarf aber auch die unbeabsichtigte Freisetzung, z.B. bei der Entsorgung biologischen Materials oder bei Unfällen rechtlicher Regelungen. Um Freisetzungen handelt es sich in beiden Fällen dann, "wenn eine bestimmte Anzahl Mikroorganismen/Viren nicht Gegenstand von physikalischem Containment" [1] sind. Freisetzung wird also derzeit in der US-amerikanischen Regelungs-Debatte definiert durch die negative Abgrenzung zu den unter L1-Bedingungen in Kauf genommenen Entweichungen von Mikroorganismen.

Die rechtliche Regelung der Risiken gentechnischer Freisetzungen ist letztlich aus dem Bestreben begründet, gesellschaftliche Unkosten einer unverhältnismäßig risikoträchtigen Technikentwicklung zu vermindern oder zu vermeiden. Dieser ökonomische Begründungszusammenhang wird heute ergänzt durch:

- Die staatliche Verpflichtung zur Verhinderung des ökologischen Zusammenbruchs und zur Wiederherstellung einer produktiven Harmonie zwischen Mensch und Natur [2] und
- die staatliche Verpflichtung, seine Bürger vor unvertretbaren Risiken der Technik zu schützen [3].

2. RISIKEN GENTECHNISCHER FREISETZUNGEN

Das besondere Problem der rechtlichen Regelung der Risiken der Gentechnik insgesamt, aber der Freisetzung insbesondere, liegt in dem hohen Maß naturwissenschaftlich-technischer Ungewißheit über Schadenseintritt und Schadensausmaß.

Die Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen könnte zur Folge haben:

- Pathogene oder infektiöse Wirkungen auf andere Organismen, Konkurrenzvorteile anderen Organismen gegenüber;
- Wirkungen in bio-geo-chemischen Prozessen, z.B. auf Mineralien, Stickstoff;
- Übertragung genetischen Materials auf andere Organismen;
- Überhandnahme der neuen Organismen nach ihrem Aussetzen [4].

Solche, durch Genmanipulationen von Umweltorganismen induzierten Wirkungen können Veränderungen von Struktur und Funktion der Ökosysteme zur Folge haben [5], ohne daß ein evolutionärer Selektionsprozeß für ökologisches Gleichgewicht "sorgen" kann. Daher ist die grundsätzliche Möglichkeit einer Störung des Umweltgleichgewichtes oder der Infektion anderer Organismen oder des Menschen als Folge der Freisetzung unbestritten, jedoch besteht unter Wissenschaftlern über Ausmaß und Wahrscheinlichkeit einer solchen Gefahr keine Einigkeit [6].

Während die einen keine wesentlichen Unterschiede zwischen spontan und unkontrolliert in der Natur ablaufenden Genvermischung und der künstlichen Rekombination im Hinblick auf mögliche Gefahren sehen [7], betonen andere die neue Qualität der Gentechnik gegenüber zufälliger Mutagenese und daraus resultierender Gefahr eines ökologischen Disasters [8]. Während die Überlebensfähigkeit gentechnisch veränderter Organismen in einem natürlichen Umfeld von einigen Wissenschaftlern bezweifelt wird [9], und die Selbstregulationsfähigkeit natürlicher Systeme bei drohenden oder eingetretenen Schädigungen durch fremde Organismen hervorgehoben wird [9], zeigen andere die potentiellen katastrophalen Folgen des Aussetzens "exotischer Organismen" auf [10].

Während einerseits Gentechnik als weiteres Instrument zur Domestizierung natürlicher Lebewesen begrüßt wird [11], wird andererseits das Aussterben von Arten befürchtet, als Folge der "Unterordnung der Biologie mit ihren bisher autonomen Gesetzmäßigkeiten unter die Gesetzmäßigkeiten der menschlichen Gesellschaft..." [12].

3. METHODEN DER RISIKOANALYSE

Gleichwohl sind Gesetzgeber und Verwaltung auch angesichts naturwissenschaftlicher Ungewißheit aufgefordert, Entscheidungen zur Zulässigkeit von Freilandversuchen mit genetisch veränderten Organismen zu treffen.

Der amerikanische Ansatz zu einer Risikoanalyse war zunächst und vor allem ein mikrobiologisch-ökologischer. Methodik und Daten einer "predictive ecology" waren jedoch nur in Ansätzen entwickelt. Auch bestanden grundsätzlich Zweifel, ob angesichts der Komplexität des Wirkungsgefüges eines Ökosystems - insbesondere hinsichtlich der Mikroorganismen - eine abschließende Risikobestimmung überhaupt vorgenommen werden kann [13].

Eine Aufklärung über die Folgen der Freisetzung genetisch veränderter Organismen in der natürlichen Umwelt sollte zunächst bei der Auswertung einzelner Fälle beginnen. Eine Beschreibung des betreffenden Biotops (eco-systems), die Charakterisierung des rekombinierten Organismus sowie denkbare Interaktionen (Genaustausch, Pathogenität, Konkurrenzen) liefern die Ausgangsdaten für eine Risikobewertung der geplanten Freisetzung. Die Schadenswahrscheinlichkeit ist dann aus folgenden Variablen bestimmbar:

- Wird der freigelassene, gentechnisch veränderte Organismus in freier Wildbahn überleben?
- Wird er sich vermehren?
- Wird er eine Nische finden, in der er seine Wirkung entfalten kann?
- Oder gibt er die neu kodierte Information an dritte Organismen weiter - ohne selbst zu überleben?
- Entfalten die gentechnisch manipulierten Eigenschaften überhaupt schädliche Wirkungen? [14]

Einflußgrößen für das Schadensmaß sind z.B. die

- Pathogenität/Toxizität einer der beteiligten Organismen (Spender, Empfänger);
- artübergreifende/artinterne Rekombination;
- Diversifikation von Erbanlage; Mobilität von Genen und Vektoren;
- Quantität der freigesetzten Organismen, der Versuchsflächen.

Die Wahrscheinlichkeit eines Risikofalles kann auf folgende Formel gebracht werden:

$$P(\text{Risiko}) = P(\text{Freisetzung}) \times P(\text{Überleben}) \times \\ P(\text{Vermehrung}) \times P(\text{Verbreitung}) \times \\ P(\text{Gen-Austausch}) \times P(\text{Schadenspotential}) [14].$$

Diesem Ansatz zur Risikoanalyse entspricht es, wenn in der Diskussion über die Zulässigkeit der Freisetzung genetisch manipulierter Organismen in den USA zwei Elemente eines Regelungsmechanismus als zwingend vorgestellt werden:

1. Die kontinuierliche Datenerfassung, Auswertung und Kontrolle der gentechnischen Freilandarbeiten, und zwar sowohl zum Zweck der Einzelfallbewertung als auch als Fundament der Entwicklung und Anpassung allgemeiner Zulässigkeitsmaßstäbe.
2. Die Erfassung aller umweltrelevanten gentechnischen Arbeiten in einem Verwaltungsverfahren (Registrier- oder Erlaubnissystem), derart, daß die Verwaltung den Antragsdaten die Unbedenklichkeit des Vorhabens entnehmen kann.

4. RECHTLICHE REGELUNGEN

Die beschriebene naturwissenschaftlich-technische Risikoerfassung wurde nun analog durch Verfahrensvorschriften zur Erfassung und Überprüfung der Freisetzungsexperimente verrechtlicht. Im folgenden sollen vier Regelungskomplexe vorgestellt werden:

1. Die "Guidelines for Research Involving Recombinant DNA-Molecules" des amerikanischen National Institute of Health (NIH-Guidelines) [15].
2. Das "Coordinated Framework for Regulating Biotechnology" der amerikanischen Regierung [16].
3. Umweltschutz-Vorschriften, die im Zuge der Vermassung und Vermarktung unbeabsichtigt freigesetzte bzw. hochwirksame gentechnische Organismen/Substanzen regulieren könnten.
4. Der National Environmental Policy Act (NEPA) [17].

4.1 Regelung des 'deliberate release' nach den NIH-Guidelines

Die Freisetzung gentechnisch veränderter MO/Viren war in den USA lediglich in der 1. Fassung der NIH-Forschungsrichtlinien verboten [18]. Ab 1978 konnten vom NIH-Direktor (Ausnahme-)Genehmigungen erteilt werden [19].

1985 veröffentlichte das NIH "Points to Consider of Experiments Involving Release of Genetically Engineered Organisms" [20]. Diese "Point to Consider..." enthalten Kriterien, anhand derer das Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) und das jeweilige Institutional Biosafety Committee (IBC) die ökologische Unbedenklichkeit der geplanten Feldversuche feststellen sollen. Gleichzeitig umreißen die "Points to Consider..." die Darlegungspflichten der Versuchsbetreiber.

Aus der Gliederung der "Points to Consider..." lässt sich in etwa die Breite der abgefragten Informationen erfassen:

1. Summary,
2. Genetic Considerations of Modified Organisms to be tested,
3. Environmental Considerations,
4. Proposed Field Trials,
5. Risk Analysis.

Wie auch bei den deutschen Sicherheitsrichtlinien handelt es sich bei den NIH-Guidelines rechtlich um Verhaltensvorschriften, die zwar für Stipendienempfänger öffentlicher Förderer, nicht jedoch allgemein verbindlich sind. Im Rahmen der Laborpraxis ist die bio- und gentechnische Industrie in der Regel der Aufforderung des NIH gefolgt, "voluntary compliance" zu üben. Die ersten Freisetzungsexperimente waren jedoch sehr umstritten und während der District Court des Districts of Columbia die erste NIH-Erlaubnis für ein Freisetzungsexperiment für rechtswidrig erklärte [21], hätte zum damaligen Zeitpunkt ein privates Unternehmen dasselbe Experiment juristisch ungehindert durchführen können.

Diese öffentliche Regelungslücke schloss die amerikanische Environmental Protection Agency (EPA) am 17. Oktober 1984 mit ihrer "Interim Policy on Small Scale Field Testing of Genetically Manipulated Microbial Pesticides" [22]. Diese "Interim Policy..." wurde dann Bestandteil des "Coordinated Framework..." von 1985 (Entwurf) und 1986.

4.2 Das "Coordinated Framework for Regulating Biotechnology" [23]

Im Gegensatz zu den NIH-Guidelines enthält das "Coordinated Framework..." Richtlinien und Entwürfe zu Gesetzesänderungen bzw. Verordnungen, die allgemein rechtsverbindlichen Charakter haben. Es trifft Regelungen für Forschung und Vermarktung, allerdings verschafft es den NIH-Forschungsrichtlinien mit ihrem Containment-Konzept und ihrer institutionalisierten Sicherheitsüberprüfung für die gentechnische Forschung keine allgemeine Rechtsgültigkeit. Das "Coordinated Framework..." bezieht sich nicht nur - wie die NIH-Guidelines - auf die Rekombinationstechnik sondern auch auf andere gentechnische Methoden wie die Zellfusion, die RNA-Technik, usw.

Damit sollten wichtige Beschränkungen in der Wirksamkeit der NIH-Guidelines überwunden werden.

Kernstück des 1985 im Entwurf und 1986 in vorläufig endgültiger Fassung vorgelegten "Coordinated Framework..." sind EPA's Regelungskonzepte im Rahmen ihrer Kompetenzen unter dem "Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act" [27] (FIFRA) und dem "Toxic Substances Control Act" [25] (TSCA). Während die EPA aber noch im Entwurf 1985 einen am grundsätzlichen Risikopotential gentechnischer Manipulationen orientierten, "process-based" Regelungsansatz vertreten hatte [26], lenkte sie in der 1986-Fassung des "Coordinates Framework..." auf ein abgestuftes, "product-based" Risikobewertungs- und Regelungskonzept ein, welches insbesondere von der Food and Drug Administration (FDA) und der Occupational Safety and Health Administration (OSHA), auf deren policy-statements hier nicht näher eingegangen werden soll, vertreten worden war.

4.2.1 Risikoabstufung

In ein Zulassungsverfahren vor einer Freisetzung sollen von der EPA einbezogen werden alle

- Mikroorganismen, die in einer ihnen fremden Umwelt freigesetzt werden (non-indigenous organisms);
- Mikroorganismen mit pathogenen Eigenschaften;
- aus unterschiedlichen Gattungen rekombinierte (intergeneric) Organismen. Lediglich anzumelden und zu überprüfen sind vorläufig, d.h. solange keine Indizien für erhöhte Risiken vorliegen,
- gattungssinternen Rekombinationen;
- Transformationen von Regulations- und Deletionsgenen;
- nicht-kommerzielle Forschung in geschlossenen Systemen, wie Labor- oder Gewächshaus-Containment [27].

4.2.2 Regelung gentechnischer mikrobieller Pestizide unter FIFRA

Pestizide - und dazu gehören nicht nur Pflanzenschutzmittel i.e.S. sondern

auch Wachstumsregler und z.B. die umstrittenen Ice-Minus-Bakterien - sind vor Gebrauch, Vertrieb, Verkauf nach § 3 FIFRA zu registrieren und dabei sicherheitsüberprüfen zu lassen. Nach § 5 FIFRA bedürfen auch Feldversuche einer Genehmigung, des Experimental Use Permit (EUP). Ausnahmen bilden jedoch small scale-Tests zur Bestimmung grundlegender Wirkungen eines neuen Mittels [28].

Diese Ausnahmeregelung wurde mit EPA's "Interim Policy..." -32] für small scale-Tests mit gentechnisch hergestellten Pestiziden aufgehoben. Aufgrund der Selbstvermehrungsfähigkeit bei gleichzeitig weitgehend unerforschten Risiken gentechnisch veränderter Organismen hielt man auch im small-scale-Test die möglichen Umwelt- und Gesundheitsgefahren nicht für vernachlässigbar. Anhand eines, den NIH - "Points to Consider..." vergleichbaren Kriterienkataloges hat das EPA - Office of Pesticide Program (OPP) die entsprechenden Darlegungen der Versuchsanmelder auf ökologische Unbedenklichkeit des Tests hin zu überprüfen. Sind Zweifel nicht ausgeräumt, muß ein formales Experimental Use Permit-Verfahren eingeleitet werden; andernfalls kann der Test durchgeführt werden. Diese 1984 formulierte "Interim Policy..." wurde auch im abschließenden "Coordinated Framework..." beibehalten, allerdings mit folgender Modifikation: Handelt es sich um ein Pestizid mit geringer Schadenswahrscheinlichkeit, so braucht der Anmelder nur Basis-Informationen vorzulegen (Testplan, Identifikation der MO, ihrer natürlichen Gewohnheiten, ihres Umweltverhaltens). In diesem "level I"-Verfahren hat die Behörde 30 Tage Zeit für ihre Entscheidung über Unbedenklichkeit bzw. weitere Überprüfung des angemeldeten Tests. Handelt es sich dagegen um ein Pestizid mit höherer Schadenswahrscheinlichkeit, so sind umfassende Informationen entsprechend der "Points to Consider..." beizubringen und die Behörde muß innerhalb von 90 Tagen eine Entscheidung herbeiführen [30].

4.2.3 Regellung gentechnischer Umwelt-Organismen nach TSCA

Weiterhin hat sich die EPA mit ihrem Ziel durchsetzen können, Einsatz und Anwendung gentechnisch veränderter Organismen unterhalb der Vermarktungsebene mit Hilfe des Toxic Substances Control Act (TSCA) zu regulieren. Der TSCA wurde 1976 als Auffanggesetz zur Risikobegrenzung durch chemische Substanzen erlassen [31].

Die Befugnis der EPA, auch Lebendmaterie nach TSCA zu regulieren, gründet sich auf die Definition von "chemical substances" in § 3 (2) TSCA, wonach Chemikalien einschließen "jede organische oder unorganische Substanz mit einer spezifisch molekularen Identität, inklusive jeglicher Verbindungen solcher Substanzen, die ganz oder teilweise als Ergebnis chemischer Reaktionen in der Natur vorkommen. Ein lebendiger Organismus ist eine solche Verbindung von "Substanzen". Außerdem ist die Nukleinsäure und damit die DNA selbst eine organische Substanz spezifisch molekularer Beschaffenheit [32].

Diejenigen Organismen oder Substanzen, die unter konkurrierende Gesetzgebungspraxis fallen, also z.B. Lebensmittel oder landwirtschaftliche Nutztiere, sind von der Regelung unter TSCA ausgenommen. Somit kann TSCA auch im Bereich der Bio- und Gentechnologie seine Funktion als Auffangtatbestand zur Risikokontrolle wahrnehmen und insbesondere zur Zulassung von umweltbezogenen eingesetzten MO/Viren, also z.B. altlastenabbauende oder im Bergbau eingesetzten MO/Viren herangezogen werden.

Wichtigstes Instrument der EPA nach TSCA ist beim derzeitigen Stand der Forschung und Entwicklung in der Gentechnik die Erfassung aller Freisetzungungen neuer Organismen mit Hilfe der "Premanufacture Notice-Rule" (PMN) des § 5 (a) (A) TSCA. Das "PMN"-Verfahren erlaubt EPA, alle neuen Chemikalien einschließlich biologischer Substanzen und lebender Mikroorganismen vor ihrer Verarbeitung, oder hier: Freisetzung, auf mögliche Risiken hin zu überprüfen und ggf. Tests zu verlangen. Zur Anwendung der PMN-Rule auf die Freisetzungversuche war zunächst die Aufhebung der Ausnahmeregelung für wissenschaftliche Versuche (TSCA § 5 (h) (3)) notwendig und EPA hat bereits eine Gesetzesänderung dahingehend angekündigt, daß auch Kleinversuche einem Anmelde- und Prüfungsverfahren unterliegen sollen. EPA beabsichtigt weiter, eine "Significant New Use Rule" für alle pathogenen oder mit pathogener DNA rekombinierten Organismen nach § 5 (a) (B) TSCA zu erlassen, um auch bereits registrierte oder natürlich vorkommende, aber pathogene bzw. mit pathogener DNA rekombinierte Substanzen/Organismen einer Überprüfung vor Freilassung zuzuführen [33].

Über Anmeldungen wird durch ein Expertengremium des EPA auf Einzelfallbasis entschieden. Die Risikoanalyse bezieht sich dabei auf die von den Produktionsanlagen (Forschungsfelder) und Produkten auf Arbeitskräfte und die allgemeine Umwelt einwirkenden Faktoren sowie auf die Möglichkeiten der Überwachung. Die von den Anwendern mit Hinweis auf die "Points to Consider" des NIH [34] verlangten Daten müssen Auskunft geben über die Überlebensfähigkeit und die Reproduktionsfähigkeit der manipulierten Organismen im natürlichen Umfeld; pathogene oder toxische Wirkungen gegenüber Mensch, Tier und Pflanze oder anderen Mikroorganismen müssen angegeben werden; die Herkunft der rekombinierten DNA ist aufzudecken, dabei ist insbesondere von Interesse, ob der Spenderorganismus eine ökologisch-zerstörerische Natur aufweist oder auch ob er vielleicht in seinem Verhalten nur weitgehend unbekannt ist. Der neue Organismus muß zweifelsfrei identifizierbar sein, ebenso der Empfängerorganismus. Die Charakterisierung muß physiologische, pathologische, genetische, taxonomische und ökologische Daten einschließen.

Anhand der so erhobenen Daten nimmt EPA dann eine "hazard-exposure"-Bestimmung vor, deren Ergebnis ("quantifiziertes Risiko") mit dem beabsichtigten Nutzen des betreffenden Freisetzungsexperiments abzuwägen ist. Die Beschußlage kann sein:

- das Risiko ist unbeachtlich;
- das Risiko ist beachtlich, aber in Kauf zu nehmen (Auflagen und Beschränkungen möglich);
- das Risiko ist nicht in Kauf zu nehmen = Verbot;
- weitere Informationen sind erforderlich [35].

Zur Weiterentwicklung der Risikobewertungsmaßstäbe und zur Erhebung bisher unbekannter oder auch akzeptierter Risiken dient die Informationserhebung und Datensammlung sowie ein umfassendes Monitorprogramm, das EPA über Sec. 8 (a) TSCA implementieren will.

Von Datenerhebung und Überwachung sind auch die minder risikoreichen gentechnischen Veränderungen mit Umweltwirkungen, also z.B. gattungsinterne, nicht-pathogene Rekombinationen erfaßt.

4.2.4 Freisetzung zu landwirtschaftlichen Zwecken unter Regelungskompetenz des United States Department of Agriculture (USDA)

Im "Coordinated Framework..." erklärt USDA [36], es wolle gentechnisch manipulierte Organismen, deren DNA, Vektoren, Spender- und Wirtsorganismen in den Kreis der nach dem "Federal Plant Pest Act" [37] regulierten Artikel ("regulated articles") aufnehmen und eine entsprechende Verordnung erlassen [38].

Tiermedizinisch eingesetzte, gentechnisch hergestellte Wirkstoffe sollen nach dem "Virus-Serum-Toxin Act" entsprechend eventueller Sicherheitsrisiken gestaffelt werden. Von den Anmeldern ist geeignetes Datenmaterial vorzulegen [39].

Außerdem hat das USDA in einer "Advanced Notice of Proposed USDA-Guidelines for Biotechnology Research" [40] die NIH-Guidelines für die von ihm geförderte Forschung übernommen und für landwirtschaftliche Zwecke spezifiziert.

Reibungslos verliefen bisher die Verfahren zur Überprüfung von Freisetzungsversuchen im Rahmen der USDA-Forschungsrichtlinien: Derzeit ist eine Liste solcher Umweltorganismen in Arbeit, die "generally regarded as safe" werden können [41], so daß sich eine Einzelfallprüfung vor Freisetzung der entsprechenden Organismen erübrigen dürfte.

4.3 Umweltgesetzliche Regelungen des "deliberate release"

Die Freisetzung rekombinierter Organismen in die Umwelt kann auch als Emission betrachtet und nach dem Clean Air Act [42]/Clean Water Act [43] reguliert werden. Ebenso kommen die Abfallgesetze, der Resource Conservation and Recovery Act [44] und der Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act [49] in Betracht.

4.3.1 Clean Air Act (CAA)

Zweck des CAA ist der Schutz und die Verbesserung der US-Luftressourcen und der öffentlichen Wohlfahrt und Gesundheit sowie der Produktivität seiner

Bevölkerung. Emissionen standortgebundener wie mobiler Luftverschmutzer, seien es chemische, physikalische oder biologische Agenzien, können mit Hilfe unterschiedlicher Regelungsstrategien beschränkt werden: Für die Limitierung sog. "criteria pollutants... which may reasonably be anticipated to endanger public health or welfare" (§ 7408 (a) (1) (A) CAA) sind "National Ambient Air Quality Standards" (NAAQS) vom EPA aufzustellen, die mit Hilfe von "State Implementation Plans" und "Air Quality Control Regions" durchgesetzt werden. Unmittelbar an der Emissionsquelle setzen die "New Source Performance Standards" (NSPS) und die "National Emission Standards for Hazardous Air Pollutants" (NESHAP) (§ 7411, 7412 CAA) an. Emissionsbeschränkungen sind so in Bau- und Betriebsgenehmigungsverfahren durchsetzbar (§ 7475 CAA). Während in der Regel aus Gründen technologischer und ökonomischer "feasibility" Null-Emissionen nicht durchsetzbar sind, lässt § 7475 CAA (NESHAP) bei solchen Pollutants, "which may reasonably be anticipated to result in an increase of mortality or an increase in serious irreversible or incapacitating reversible, illness..." Maßnahmen zur Durchsetzung eines "ample margin of safety to protect the public health" unabhängig von Kostenerwägungen zu. Im Falle anznehmender hoher Gefährdungen durch eine Freisetzung z.B. pathogener Organismen könnten so nach dem Clean Air Act ein Freisetzungsverbot solcher gefahrenträchtiger Organismen erreicht werden.

Da die Regelungsmechanismen des Clean Air Act ansonsten nur bei annehmenden Gefährdungen (nicht schon bei Risiko-Vermutung!) durch zudem "major facilities" ausgelöst werden, und auf Emissions- oder Immissionsbegrenzungen und nicht Vermeidung zielen, sind sie für die Regelung des ungewissen Risikopotentials der Freisetzung gentechnisch manipulierter Organismen im derzeitigen Stadium ungeeignet [46].

4.3.2 Water Pollution Control Act ("Clean Water Act") (FWPCA/CWA)

Zweck des Clean Water Acts ist die Kontrolle und Begrenzung von Abwassereinleitungen in die Gewässer der USA. Die Regelungen umfassen ein Erlaubnisprogramm, in dessen Rahmen EPA oder eine entsprechende Länderbehörde Abwassermengenbegrenzungen, Kontrollen und Berichtspflichten für einzelne Einleiter festsetzen kann, technologische Standards für die Abwasserreinigung in bestimmten Industriebereichen vorschreiben (§ 1311) und Wasser-Qualitäts-Standards vorgeben (§ 1313) kann, sowie das Einleiten von Öl und anderen "hazardous substances" untersagen bzw. begrenzt zugelassenes Einleiten überwachen kann (§ 1321).

Während es denkbar ist, beabsichtigt oder unbeabsichtigt freigesetzte und in Gewässer gelangte gentechnische Organismen als "biological material" unter "pollutants" zu subsumieren [47], eignen sich die Regelungen des Clean Water Act, ähnlich wie die des Clean Air Act, nicht für eine globale Risikoerfassung derzeit noch in kleinem Maßstab und zeitlich wie örtlich verstreut ausgesetzt-

ter Organismen [46], die wenn ihnen ein Risikopotential zugemessen wird, auf Grund ihrer Selbstvermehrungsfähigkeit außerdem nicht mit Hilfe von Grenzwertsetzungen regulierbar sein werden. Für "hazardous biological pollutions" wäre allerdings ein Einleiteverbot nach § 1321 FWPCA vorstellbar.

4.3.3 Resource Conservation and Recovery Act (RCRA), Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act (CERCLA)

Beide Gesetze regulieren in erster Linie "hazardous waste", wobei RCRA die Vermeidung bzw. gefahrlosen Transport, Lagerung, Beseitigung, bzw. Behandlung von Giftmüll sicherstellen und CERLA über die Einrichtung eines "Superfunds" die Sanierung von Müllkippen und anderen Altlasten durchsetzen und finanzieren soll [46].

Wie schon bei den Clean-Water- und Clean-Air-Gesetzen ist auch hier wieder die Regulierung auslösende Schwelle des "hazardous" waste so hoch ange setzt, daß angesichts der noch über die gentechnischen Risiken - des zur Freisetzung in Frage kommenden Kreises von Organismen - herrschende Ungewißheit die Regelungsinstrumente kaum greifen werden. Allerdings ist der Kompetenzbereich der EPA unter den genannten Umwelt- und Abfallgesetzen so breit, daß eine entsprechende Verordnungsgebung nicht ausgeschlossen werden kann.

EPA's Bemühung, sich gemäß § 6927 (a) RCRA mit Hilfe einer Erhebung einen Überblick über Aufkommen und Behandlung biologischer Abfälle in der biotechnischen Industrie zu verschaffen, scheiterte am Widerstand der Unternehmen, die das regierungsamtliche "Office of Management and Budget" (OMB) auf seine Seite ziehen und damit EPA's Befragungsaktion stoppen konnte [41].

Zusammenfassend lässt sich sagen: Die amerikanische Umweltbehörde (EPA) hat unter dem - Clean Air Act,
- Clean Water Act und den
- Abfallgesetzen (RCRA/CERCLA)

breite Kompetenzen zur beschränkenden Kontrolle von emittierenden biologischen Substanzen/Organismen. Die Eingriffsschwelle setzt, wenn auch nicht immer die nachgewiesene Gefahr, so doch in der Regel die wahrscheinliche Gefährdung, die für Leben und Gesundheit von einer "major facility" ausgeht, voraus.

Null-Emissionen - wie sie derzeit für Freisetzungsversuche mit gentechnisch veränderten MO/Viren mit nicht ausschließbarem Risikopotential für sinnvoll gehalten werden, sind unter den genannten Gesetzen auch nur schwer durchsetzbar: Die nötige Abwägung des Umweltschutzes mit den ökonomischen Interessen begünstigt immer die Grenzwertkonzepte.

Deshalb erscheinen die traditionellen umweltrechtlichen Instrumentarien genannter Gesetze derzeit weniger geeignet, mit dem hohen Maß an Ungewißheit der sich in der Experimentierphase befindlichen gentechnischen Freisetzungen umzugehen.

4.4 National Environmental Polity Act (NEPA) [48]

Als eine ergänzende wichtige Norm für die Durchsetzung von Umweltbelangen und ein bedeutendes Kontrollinstrument neuen und umweltrelevanten Technologien gegenüber muß - auch im Falle gentechnischer Freisetzungen - NEPA angesehen werden.

NEPA wurde 1969 vom Congress verabschiedet und hat seither unzweifelhaft zu einer verstärkten Berücksichtigung von Umweltaspekten in Verwaltungsentscheidungen, bei der Vergabe öffentlicher Gelder, bei der Aufstellung von politischen Programmen und im Gesetzgebungs- und Normsetzungsverfahren geführt [49]. Zweck des Gesetzes ist:

- die Förderung einer produktiven und fruchtbaren Harmonie zwischen Mensch und Umwelt zum Grundsatz nationaler Politik zu erklären;
- alle Anstrengungen zur Verhinderung oder Ausmerzung von Schäden an Umwelt oder Biosphäre zu fördern und Gesundheit und Wohlergehen der Menschen zu ermöglichen;
- das Verständnis für die Ökosysteme und natürlichen Ressourcen, die für die Nation von Bedeutung sind, zu bereichern;
- einen Rat für Umweltqualität (Council on Environmental Quality) zu etablieren (NEPA § 2).

Umgesetzt werden sollen die genannten Ziele durch die Verpflichtung aller öffentlichen Stellen, Behörden, Regierungsämter usw., vor jedem, nicht unerheblichen Handeln des Bundes ("major federal actions"), das die Qualität der Umwelt des Menschen in bemerkenswerter Weise beeinträchtigt ("significantly affecting the quality of the human environment"), ein "Environmental Impact Statement" (EIS) abzugeben, also eine Umweltverträglichkeitsprüfung vorzunehmen (NEPA § 102c). Ein EIS muß beschreiben:

- jede mögliche schädliche Nebenwirkung, die nicht vermieden werden kann;
- die Alternativen zu den vorgesehenen Maßnahmen unter Einschluß einer Kosten-Nutzen-Abwägung;
- das Verhältnis zwischen lokalem und kurzfristigem Verbrauch menschlicher Umwelt und der Wahrung und Förderung langfristiger Produktivität und
- jeglichen unwiederbringlichen und unersetzblichen Verbrauch von Rohstoffen, der mit der Maßnahme einherginge (NEPA § 102 C i-v).

§ 101 (a) NEPA nennt "new and expanding technological advances" als wichtigen Einflußfaktor im Verhältnis Mensch-Umwelt. Zur Erfassung der Umwelt-Folgen neuer Technologien dienen die programmatischen (im Gegensatz zu den "site-specific") Environmental Impact Statements, die gerade im Vorfeld massiver ökonomischer und ökologischer Investitionen Fehlentwicklungen vermeiden helfen sollen [46].

Als das National Institute of Health (NIH) dann im Frühjahr 1984 einen Freilandtest mit Ice-Minus-Bakterien an Erdbeerplanten genehmigte, erwirkte die

"Foundation on Economic Trends" eine einstweilige Verfügung des Inhalts, daß bis zur Entscheidung in der Hauptsache weder das Experiment der Universität of California noch andere Freisetzungsexperimente unter den NIH-Guidelines zu genehmigen seien [50]. Das Gericht hatte sowohl die 1978 erfolgte Aufhebung des Freisetzungsverbotes wie auch die hierauf basierende Einzelgenehmigung zugunsten der University of California wegen Verstoß gegen den National Environmental Policy Act für unzulässig erklärt [21]. Beide Verwaltungsent-scheidungen seien "major federal actions" mit signifikanten Umwelteinwirkun-gen im Sinne des § 102 (C) NEPA, der die Anfertigung eines formalen EIS er-forderte, das aber von NIH nicht erbracht worden sei.

Nach Auffassung des Gerichts hatte NIH weder den notwendigen "hard look" beliefert, noch ernsthaft alternative Forschungsmöglichkeiten geprüft. Das Ice-Minus-Urteil hat dazu geführt, daß NIH seine Zulassungsentscheidungen in Folge mit Hilfe der "Points to Consider..." auf eine detaillierte mikrobiologische-ökologische Risikobewertung fußte. Im Rahmen der Regelung des "deliberate release" unter EPA haben NEPA und sein EIS zwar direkt keine Rolle ge-spielt - EPA ist auf Grund der "functional equivalency doctrine" von der Pflicht zur Erstellung eines EIS entbunden [46]. Die in der Ice-Minus-Entscheidung auf-gestellten Grundsätze zur Anwendung des NEPA bei Freisetzen gentech-nisch modifizierter Organismen dürfte jedoch auch auf EPA's Regelungskonzept er-heblichen Einfluß gehabt haben.

LITERATUR

1. Strauss, H.S.: How many microbes really constitute environmental release? Bio/Technology 5 (1987), 232
2. National Environmental Protection Act (NEPA): United States Code Annotated (USCA) 42 (1969), 4321
3. Benda, E.: Technische Risiken und Grundgesetz. In: Blümel, W., Wagner, H. (Hrsg.): Technische Risiken und Recht. Veröffentlichung des Kernforschungszentrums Karlsruhe 1981
4. Organisation of Economic Cooperation and Development (OECD): Recombinant DNA Safety Considerations, Paris 1986
5. Sharples, F.E.: Regulation of Products from Biotechnology. Science 235 (1987), 1329
6. Subcommittee on Investigation and Oversight - Committee on Science and Technology, U.S. House of Representatives: The Environmental Implications of Genetic Engineering. In: U.S. Government Printing Office, Washington 1984

7. Simberloff, D.: Committee on Environmental and Public Works - Subcommittee on Toxic Substances and Environmental Oversight: Hearing on the Potential Environmental Consequences of Genetic Engineering. In: U.S. Government Printing Office, Washington 1984
8. Rifkin, J.: Committee on Environmental and Public Works (s. Ann. 7)
9. Davis, B.D.: Science, Fanatism and the Law. Genetic Engineering. News 4 (1984), 4
10. Congressional Hearing on the Environmental Implications of Genetic Engineering. Recombinant DNA Technical Bulletin 9 (1983), 103
11. Davis, B.D.: Bacterial Domestication: Underlying Assumptions. Science 235 (1987), 1329
12. Europäisches Parlament - Ausschuß für Rechte und Bürgerrechte. In: Berichte über die Biotechnologie in Europa und die Notwendigkeit einer integrierten Politik (1986) Persönliche Mitteilung
13. Enquetekommission des Deutschen Bundestages: Chancen und Risiken der Gentechnologie, Bonn 1986
14. Alexander, M.: Ecological Consequences: Reducing the Uncertainties. Issues in Science and Technology, (1985), 57
15. Federal Register 51 (1986), 16957
16. Presidential Office of Science and Technology Policy (OSTP), Policy Announcement. In: Federal Register 51 (1986), 23302
17. United States Code Annotated (USCA) 42 (1969), 4321
18. Federal Register 41 (1976), 27911
19. Federal Register 43 (1978), 33167
20. Federal Register 50 (1985), 12456
21. Foundation on Economic Trends versus Heckler. Environmental Law Reporter 14 (1984), 20467

22. Federal Register 49 (1984), 40659
23. Federal Register 51 (1986), 23302
24. United States Code Annotated (USCA) 7 (1972), 136
25. United States Code Annotated (USCA) 15 (1976), 2601
26. Federal Register 49 (1984), 50856
27. Federal Register 51 (1986), 23301, 23311
28. Code of Federal Regulations (CFR) 40, 172
29. Federal Register 49 (1984), 40659
30. Federal Register 51 (1986), 23301, 23321
31. United States Code Annotated (USCA) 15 (1976), 2601
32. Federal Register 51 (1986), 23301, 23324
33. Federal Register 51 (1986), 23301, 23330
34. Federal Register 50 (1985), 12456
35. Russell, M., Gruber, M.: Risk Assessment in Environmental Policy Making. Science 236 (1987), 236
36. Federal Register 51 (1986), 23301
37. United States Code Annotated (USCA) 7 (1957), 150aa
38. "Introduction of Organisms and Products Altered or Produced Through Genetic Engineering Which are Plant Pest or Which There is Reason to believe are Plant Pests". Federal Register 51 (1986), 23342
39. Federal Register 51 (1986), 23301, 23339
40. Federal Register 51 (1986), 23301, 23367
41. Fox, J.L.: The US Regulatory Patchwork. Bio/Technology 5 (1987), 1273

42. United States Code Annotated (USCA) 42 (1970), 7401
43. United States Code Annotated (USCA) 33 (1977), 1251
44. United States Code Annotated (USCA) 42 (1976), 6901
45. United States Code Annotated (USCA) 42 (1980), 9601
46. Korwek, E.L., de la Gruz, P.L.: Federal Regulation of Environmental Releases of Genetically Manipulated Microorganisms. Rutgers Computer and Technology Journal 11 (1985), 301
47. Karny, G.M.: Regulation of Genetic Engineering: Less Concern about Frankenstein but Time for Action on Commercial Production. University of Toledo Law Review 12 (1981), 815
48. United States Code Annotated 42 (1969), 4321
49. Chalker, S.M., Catz, R.S.: A Case Analysis of NEPA Implementation: NIH and DNA Recombinant Research. Duke Law Journal (1978), 57
50. Mahro, G.: Zur Zulassung einer Freisetzung gentechnisch manipulierter Organismen im Feldversuch in den USA. Natur und Recht 8 (1986), 324

Stand der Beratungen über Regelungen zur Freisetzung genetisch veränderter Mikroorganismen und Viren in der Bundesrepublik Deutschland und auf EG-Ebene

G. Schubert

*Wertungen geben die Meinung des Autors wieder

1. REGELUNGEN AUF EG-EBENE

1.1 Zur Vorgeschichte

Bemühungen der EG zu Regelungen auf dem Gebiet der Gentechnik reichen bis in die 70er Jahre zurück. Damals (1979) legte die Kommission den "Vorschlag einer Richtlinie des Rates zur Festlegung von Sicherheitsmaßnahmen gegen hypothetische Gefahren beim Umgang mit neukombinierter DNS" vor (EG-Dok. Nr. 5899/79; BT-Drucks. 8/2890). Das Vorhaben wurde letztlich nicht weiterverfolgt. Es blieb zunächst bei einer "Empfehlung des Rates betreffend die Erfassung von Arbeiten über neukombinierte Desoxyribonukleinsäuren (DNS)" vom 30. Juni 1982 (82/472/EWG, ABI. EG Nr. L 213/15 vom 21. Juli 1982). Sie beschränkte sich darauf, den Mitgliedstaaten die ständige Erfassung und Analyse der (hypothetischen) Risiken der Gentechnik nahezulegen.

Die nie ganz aufgegebenen Bemühungen der EG um Regelungen zur Gentechnik wurden neu angestoßen durch die Einrichtung des "Biotechnology Regulation Interservice Committee" (BRIC) im Jahr 1985. Dieser aus mehreren Generaldirektionen der Kommission bestehenden Arbeitsgruppe wurde aufgetragen, Regelungen zur Gentechnik auf Gemeinschaftsebene vorzubereiten. Die dann aufgenommenen Arbeiten sind nun zu einem vorläufigen Abschluß gekommen.

1.2 Gegenwärtiger Stand allgemein

Gegenwärtig existieren auf EG-Ebene zur Gentechnik drei Richtlinien-Entwürfe, nämlich

- einer über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit (als siebente Einzelrichtlinie i.S. von Art. 8 der Richtlinie 8/1107/EWG; gestützt auf Art. 118A EWG-Vertrag),
- einer "on the contained use of genetically modified microorganisms" (erfaßt ursprünglich getrennt diskutierte Entwürfe "on the contained use of ge-

netically modified microorganisms which do not cause human disease" und "on the prevention of accidents and control of wastes from the contained use of genetically modified microorganisms" zusammen) und

- einer "on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms".

Weitere Expertengespräche zu den Richtlinien auf Kommissionsebene soll es offenbar nicht mehr geben. Es ist zu erwarten, daß die Kommission die Entwürfe als offizielle Richtlinievorschläge während der deutschen Präsidentschaft im ersten Halbjahr 1988 dem Rat zuleitet.

1.3 Zur Regelung der Freisetzung

Hier interessiert insbesondere der Richtlinien-Entwurf zur Freisetzung. Da es noch keinen offiziellen deutschen Text gibt, müssen Inhalt und Probleme des Entwurfs an Hand des englischen Textes vorgestellt werden. Aus Zeitgründen muß sich die Darstellung auf die wesentlichen Punkte beschränken.

Zweck der Richtlinie ist (so Artikel 1 und die der Richtlinie voranstehenden Erwägungsgründe) die Angleichung der Rechtsvorschriften und der Verwaltungsverfahren der Mitgliedstaaten. Bei dieser Rechtsangleichung sollen zugleich Forschung und Entwicklung der Gentechnik und ihre industrielle Nutzung gefördert und ein hoher Standard der Sicherheit von Mensch und Umwelt gewährleistet werden. Damit ist auf die Anforderungen in Art. 100A Abs. 3 EWG-Vertrag hingewiesen.

Die Richtlinie soll die Freisetzung von "genetically modified organisms" (GMO) regeln. Was sie darunter versteht, legt sie in einer Definition in Artikel 2 Nr. 2 fest. Danach sind GMOs "organisms of which the genetic material is altered in a way that passes the natural barriers of mating and recombination". Ein Annex I zur Richtlinie "illustriert", was konkret damit gemeint ist, indem er jene Techniken benennt, die von der Richtlinie erfaßt und nicht erfaßt sein sollen.

Artikel 3 des Entwurfs enthält eine Art Generalklausel. Die Mitgliedstaaten sollen sicherstellen, daß, wer eine Freisetzung vornimmt, "shall take all measures reasonably practicable to control the risk of harm to people or the environment". Wir kommen auf diese Stelle noch zurück.

Der Entwurf unterscheidet grundsätzlich zwischen Freisetzungen "for the purpose of research and development" einerseits (Art. 4 bis 7) und dem "placing on the market of products containing or consisting of genetically modified organisms" (Art. 1 Nr. 1 und Art. 8ff.) andererseits. Zunächst zum Bereich Forschung und Entwicklung.

Wer zum Zweck der Forschung und Entwicklung einen genetisch veränderten Organismus freisetzen will, muß das bei der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem die Freisetzung erfolgen soll, notifizieren (Art. 4 N. 1). Bei der "notification" sind vorzulegen (Art. 4 Nr. 2)

- ein "technical dossier", das alle für eine Risikobewertung nötigen Informationen sowie die verwendeten Methoden und bibliographischen Nachweise darzu enthält und
- eine Risikobewertung durch den "notifier".

Nähere Anforderungen an das "technical dossier" legt ein Annex II fest. Insbesondere werden Informationen gefordert über

- den freigesetzten Organismus,
- den Ort, an dem freigesetzt werden soll,
- Zweck und Bedingungen der Freisetzung (z.B. Menge der Organismen, Größe des Gebietes, Dauer der Freisetzung) und
- Kontrollmethoden und Alarmpläne für den Fall unvorhergesehener Entwicklungen.

Die zuständige Behörde im Mitgliedstaat soll die vorgelegten Unterlagen prüfen und einen Bewertungsbericht erstellen. Binnen neunzig Tagen soll sie

- entweder das "endorsement" der "notification" beschließen
- oder dem "notifier" mitteilen, welche weiteren Informationen sie zur Entscheidung benötigt oder welche zusätzlichen Maßnahmen er treffen soll.

Die Versagung des "endorsement" ist nicht vorgesehen. Freigesetzt werden darf aber erst, wenn das "endorsement" erfolgt ist (Art. 6 Nr. 2).

Bei der Entscheidung über das "endorsement" soll die zuständige Behörde des Mitgliedstaates sich davon überzeugen, "that the notification is complete, adequate, and in compliance with this Directive, and that the proposed release is in conformity with Article 2" (Art. 6 Nr. 1). Damit ist auf die oben zitierte Generalklausel verwiesen.

Die Freisetzung von Produkten, die genetisch veränderte Organismen sind oder enthalten, knüpft an das Verfahren bei der Freisetzung im Rahmen von Forschung und Entwicklung an, enthält aber in den Artikeln 8 ff Besonderheiten.

Einige Produktgruppen, wie z.B. Arzneimittel, Lebens- und Futtermittel sowie Nutztiere und Nutzpflanzen sollen von den Regelungen der Artikel 8 ff nicht erfaßt werden (Art. 1 Nr. 2). Damit bleibt zunächst unklar

- was denn für die Artikel 8 ff an Regelungsgegenständen noch übrig bleibt und
- was für die aus der Regelung entlassenen Produktgruppen gelten soll.

Davon, daß etwa die Richtlinien der EG zu Arzneimitteln um den Aspekt der Freisetzung genetisch veränderter (Mikro-)Organismen ergänzt werden sollen, ist bislang nichts bekannt geworden.

Wegen der bei der "notification" vorzulegenden Unterlagen wird auch für Produkte zunächst auf Annex II verwiesen. Darüber hinaus werden einige Zusatzinformationen verlangt, insbesondere "conditions of use and handling", die ein Annex III konkretisieren.

Wie bei der "notification" von Vorhaben im Bereich Forschung und Entwicklung hat die zuständige Behörde des Mitgliedstaates, in dem das Produkt erstmals in den Verkehr gebracht werden soll, in einer Frist von neunzig Tagen den "notifier" aufzufordern, noch fehlende Informationen vorzulegen oder die nach der Richtlinie nötigen Maßnahmen im Hinblick auf den Schutz von Mensch und Umwelt zu treffen (Art. 9 Nr. 4). Die nationale Behörde kann aber bei positivem Prüfergebnis nicht aus eigener Kompetenz das "endorsement" erteilen. Sie muß vielmehr eine Zweischrift der Notifikationsunterlagen zusammen mit einem Bewertungsbericht der Kommission zuleiten (Art. 9 Nr. 3). Die Kommission beteiligt die anderen Mitgliedstaaten. Sind sich die Mitgliedstaaten über die zu treffende Entscheidung nicht einig, wird ein mit Experten aus den Mitgliedstaaten besetzter Ausschuß (Art. 16) einberufen. Letztlich entscheidet über die Freisetzung die Kommission (Art. 10 Nr. 4). Diese Entscheidung gilt für alle Mitgliedstaaten (Art. 10, Nr. 7, Art. 17).

Was die Entscheidungskriterien angeht, so fehlt bei den Regelungen über Produkte der Verweis auf die Generalklausel in Artikel 3. Ausschlaggebend soll wohl sein, ob das Inverkehrbringen des Produktes "may pose risks to people or the environment" (Art. 10 Nr. 4).

Daneben sieht der Entwurf u.a. noch Regelungen vor zur

- Kennzeichnung und Verpackung von Produkten (Art. 12)
 - Vertraulichkeit (Art. 11)
 - sog. Zweitanmelderproblematik (Art. 4 Nr. 5 und Art. 8 Nr. 3) und
 - zu regelmäßigem Informationsaustausch und zu Berichtspflichten der Mitgliedstaaten und der Kommission (Art. 14 und 19),
- auf die hier nur allgemein hingewiesen werden kann.

Besonders erwähnt werden soll aber noch die vorgesehene Regelung zur Anpassung der Richtlinie an den Stand von Wissenschaft und Technik. Nach Artikel 15 des Entwurfs sollen alle Annexe, also auch der den Anwendungsbereich der Richtlinie bestimmende Annex I, von der Kommission nach Anhörung des schon erwähnten Sachverständigen-Ausschusses dem technischen Fortschritt angepaßt werden. Damit wäre dieser wichtige Bereich der Entscheidung durch die Mitgliedstaaten weitgehend entzogen.

1.4 Noch offene Fragen

Diese so nur grob skizzierten Regelungen lassen noch eine ganze Reihe von Fragen offen, von denen nun nur die wichtigsten noch kurz angesprochen werden sollen.

- Ist der vorgesehene Geltungsbereich der Regelung klar genug bestimmt und sachgerecht umschrieben?
- Decken die beiden Regelungsbereiche Forschung und Entwicklung einerseits und Produkte andererseits alle regelungsbedürftigen Sachverhalte ab?
- Was genau ist unter "notification" und "endorsement" zu verstehen? Was wäre

die Entsprechung dazu in der deutschen Rechtsordnung? Die Kommission hat verschiedentlich Verbindungen zwischen dem Richtlinien-Entwurf und den EG-Regelungen zu gefährlichen Stoffen hergestellt, insbesondere zur sechsten Änderungsrichtlinie vom 18. September 1979 (Richtlinie 79/831/EWG, ABI. EG Nr. L 259/10 vom 15. Okt. 1979). Der Begriff "endorsement" kommt dort aber - wie bislang im EG-Recht überhaupt - nicht vor. Es muß also schon etwas mehr sein als nur die vom Chemikalienrecht her bekannte Anmeldung (§ 4 des Gesetzes zum Schutz vor gefährlichen Stoffen vom 16. Sept. 1980, BGBl. I S. 1718), was der Freisetzung genetisch veränderter Organismen vorausgehen soll.

- Welche genau sollen die Entscheidungskriterien für die nationalen oder EG-Behörden sein? Die in Annex II des Entwurfs genannten Gesichtspunkte sind wichtige "points to consider", aber keine Kriterien im hier gemeinten Sinn. Wirkliche Kriterien deutet die Generalklausel in Art. 3 an. Aber sind sie ausreichend?
- Ist es akzeptabel, wie vorgesehen die Entscheidung über das Inverkehrbringen von Produkten, die genetisch veränderte Organismen sind oder enthalten, der EG-Kommission zu überlassen?
- Soll die Kommission über die Befugnis zur Änderung der Annexe die wichtige Entscheidung über den Anwendungsbereich der Richtlinie künftig weitgehend allein treffen können?

1.5 Ausblick

Über diese Fragen wird in der Bundesrepublik und dann im Rahmen der anstehenden Ratsverhandlungen gesprochen werden müssen. Die Kommission stützt ihren Entwurf auf Artikel 100 A EWG-Vertrag. Das bedeutet, daß über einen Vorschlag mit Mehrheit entschieden wird und die Bundesrepublik Mitstreiter braucht, wenn sie aus ihrer Sicht unerwünschte Regelungen verhindern will. Daß solche Regelungen drohen könnten, ist nicht auszuschließen, wenn man den Inhalt des Richtlinien-Entwurfs und die Empfehlungen der Enquete-Kommission "Chancen und Risiken der Gentechnologie" einander gegenüberstellt.

2. REGELUNGEN IN DER BUNDESREPUBLIK

2.1 Gegenwärtige Rechtslage

Vielfach ist zu hören, die Gentechnik sei in der Bundesrepublik nicht geregelt. Das ist falsch und richtig zugleich.

Falsch ist die Aussage deshalb, weil es für menschliches Handeln mit Außenwirkung grundsätzlich keinen rechtsfreien Raum gibt. Wer durch sein Verhalten anderen vorwerfbar Schaden zufügt, muß dafür zivilrechtlich und ggf. auch strafrechtlich haften, d.h. er muß Schadenersatz leisten und wird unter Umständen auch bestraft, z.B. wegen fahrlässiger Körperverletzung oder Tötung.

Und wo durch eine Handlung oder einen Zustand eine Gefahr droht, können die Ordnungsbehörden einschreiten. Das gilt auch im Hinblick auf die Gentechnik und die Freisetzung genetisch veränderter Organismen.

Die Aussage (es gäbe keine Regelung zur Gentechnik) ist aber insofern richtig, als es keine oder doch nur eine unzulängliche Regelung zum Schutz vor Risiken der Freisetzung genetisch veränderter Organismen durch präventive staatliche Kontrolle gibt. Die von der Bundesregierung beschlossenen Genrichtlinien (Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in-vitro neu kombinierte Nuklein-säuren, 5. Fassung vom 28. Mai 1986, BAnz. Nr. 109 vom 20. Juni 1986). enthalten zwar unter Nr. 19 auch ein grundsätzliches Verbot der Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen. Ausnahmen von dem Verbot bedürfen der Zulassung (Erlaubnis) durch das Bundesgesundheitsamt. Diese Regelung ist aber

- in Anwendungsbereich und Bestimmtheit unzulänglich und vor allem
- durchsetzbar nur für den Bereich der vom Bund geförderten Forschung.

Zwar hat sich die Industrie den Richtlinien und damit auch der Regelung zur Freisetzung im Wege der freiwilligen Selbstbindung unterworfen, und bislang haben sich die Autorität der Richtlinien und das Verantwortungsbewußtsein von Wissenschaft und Industrie auch durchaus bewährt. Gleichwohl wird die Notwendigkeit einer gesetzlichen, allgemein verbindlichen und notfalls auch durchsetzbaren Regelung zur Freisetzung kaum noch bestritten. Die Empfehlungen der Enquete-Kommission "Chancen und Risiken der Gentechnologie" (BT-Drucks. 10/6775) fordern eine solche Regelung, und auch die Entwicklung in der EG geht, wie oben dargestellt, in diese Richtung. Deshalb kann die Frage letztlich offen bleiben, ob nicht der Gesetzgeber, nach den vom Bundesverfassungsgericht im sog. Kalkar-Beschluß (BVerfGE 49, 89ff., 126 ff.) herausgearbeiteten Grundsätzen, verfassungsrechtlich verpflichtet ist zu entscheiden, inwieweit die Gentechnik, auch was die Freisetzung genetisch veränderter Organismen angeht, entwickelt und genutzt werden darf.

2.2 Künftige Regelungen

Wie eine solche Regelung zur Freisetzung genetisch veränderter Organismen konkret aussehen soll, ist politisch noch nicht entschieden. Die Beratungen zu den Empfehlungen der Enquete-Kommission in den Ausschüssen des Deutschen Bundestages haben noch gar nicht richtig angefangen. Auch die Bundesregierung hat sich noch nicht endgültig festgelegt. In dieser Situation möchte ich mich darauf beschränken, einige Fragen an eine künftige Regelung zu stellen und allgemein zu kommentieren.

1. Frage: Wer soll die Regelungen erlassen? Das ist die Frage nach der Gesetzgebungskompetenz. Der Bund hat Gesetzgebungskompetenzen nur, soweit sie ihm die Verfassung in den Artikeln 70 ff. des Grundgesetzes zugesteht. Ob sich aus den einschlägigen Artikeln nach ihrem gegenwärtigen Stand eine Kompetenz des Bundes zu umfassenden Regelungen zur Gentechnik und der Freiset-

zung genetisch veränderter Organismen begründen läßt, kann hier nicht eingehend diskutiert und endgültig entschieden werden. Die bisherigen Überlegungen im politischen Raum gehen jedenfalls davon aus.

Wer, d.h. welches Ressort im Bund die Regelungen federführend vorbereitet, ist dann eine weitere, hier nicht primär interessierende Frage, die im übrigen mit Frage 2 zusammenhängt.

2. Frage: Wie soll die künftige Regelung formal ausgestaltet sein? Sollen einzelne bestehende Regelungen ergänzt werden oder ist eine selbständige allgemeine Regelung zur Freisetzung zu treffen?

Genetisch veränderte Organismen werden künftig auch in Form von Produkten in den Verkehr gebracht und damit freigesetzt werden, für die bereits Regelungen mit dem Ziel präventiver Gefahrenabwehr existieren. In nenne als Beispiel die Arzneimittel. Es liegt nahe zu prüfen, ob und inwieweit solche bestehenden Regelungen bereits jetzt auch jene besonderen Aspekte mit erfassen, die sich aus dem Freisetzen eines genetisch veränderten Organismus ergeben können oder ob diese Vorschriften um diesen Aspekt zu erweitern sind. Solche Spezialregelungen werden aber, auch in ihrer Summe, nicht zu einer alle Bereiche der Freisetzung abdeckenden Regelung führen, sondern Regelungslücken lassen. Die Frage ist, ob diese Regelungslücken bestehen bleiben können. Denkbar wäre eine allgemeine Regelung für alle jene Freisetzungen, die von Spezialregelungen nicht erfaßt werden.

3. Frage: Wie soll die Regelung inhaltlich ausgestaltet sein?

Hier sind Unterfragen nötig.

Erste Unterfrage: Soll die Freisetzung genetisch veränderter Organismen ausnahmslos untersagt werden?

Die Forderung nach einem solchen Verbot kommt z.B. aus den Reihen der Grünen. Aber auch die Enquete-Kommission hat, jedenfalls für Viren und Mikroorganismen und z.T. befristet, ein Freisetzungsverbot grundsätzlich ohne Ausnahme empfohlen. Zur Begründung wird insbesondere auf das noch begrenzte Wissen über die Risiken der Gentechnik und die Möglichkeit ihrer Beherrschung hingewiesen.

Damit ist ein allgemeines Problem angesprochen. Erklärtes Ziel sowohl auf EG-Ebene als auch in der Bundesrepublik ist es, sich politisch mit neuen Technologien zu einem möglichst frühen Zeitpunkt auseinanderzusetzen, bevor Entwicklungen nicht mehr umkehrbar sind. Das hat aber auch zur Folge, daß politische Entscheidungen, auch des Gesetzgebers, mitunter auf sachlichen Grundlagen getroffen werden müssen, die noch in weit höherem Maße unsicher sind, als das im Bereich neuer Technologien ohnehin oft der Fall ist.

Im Augenblick ist nicht entschieden, ob diese Unsicherheit den Gesetzgeber zu einem ausnahmslosen Verbot veranlassen wird. Es ist auch eine Regelung vorstellbar, die die Freisetzung genetisch veränderter Organismen von vorheriger staatlicher Prüfung und Genehmigung abhängig macht und damit den Umgang mit der Ungewißheit im Einzelfall der Exekutive überläßt.

Zweite Unterfrage: Nach welchen Kriterien soll die Exekutive den Einzelfall beurteilen?

Hier sind zunächst eine ganze Reihe von Gesichtspunkten vorstellbar. Die Entwicklung und Anwendung genetisch veränderter Nutztiere und Nutzpflanzen kann z.B. erwünschte oder unerwünschte Folgen für die Struktur der Landwirtschaft haben. Es kann die Frage nach dem Bedürfnis für einen neuen Organismus gestellt werden oder danach, ob er nicht mittelbar unerwünschte Verhaltensweisen hervorrufen kann, etwa vermehrten Herbizideinsatz, wenn herbizidresistente Pflanzen angebaut werden.

Vermutlich wird sich eine Regelung aber auf die Gesichtspunkte Schutz der menschlichen Gesundheit und der Umwelt beschränken. Das entspräche zumindest der Art, wie sich der Gesetzgeber bisher primär mit neuen Technologien, z.B. auch der Kernenergie, auseinandergesetzt hat. Es ist auch kaum eine Behörde vorstellbar, die auf administrativem Weg über alle politischen, sozialen, wirtschaftlichen, ethischen und sonstigen Konsequenzen der Freisetzung genetisch veränderter Organismen entscheiden könnte.

Dritte Unterfrage: Wie konkret, wie detailliert soll die Regelung sein?

Im Recht der Technik ist es üblich, daß die Regelung im Gesetz selbst sich auf generelle, abstrakte Formulierungen mit unbestimmten Rechtsbegriffen beschränkt und Einzelheiten in Rechtsverordnungen oder Verwaltungsvorschriften verweist. Diese Technik des Rechts der Technik erleichtert die schnelle Aufnahme neuer Erkenntnisse und Entwicklungen in die Rechtsordnung. Danach wäre eine Regelung vorstellbar, die Freisetzungen unter der Voraussetzung erlaubt, daß Gefahren für Mensch und Umwelt mit hinreichender Sicherheit ausgeschlossen sind.

Das Problem für den, der mit einer solchen Vorschrift umgehen muß, liegt in der Konkretisierung dessen, was unter "hinreichender Sicherheit" zu verstehen ist. Ich gehe davon aus, daß zumindest in Teilbereichen das Wissen über das Verhalten neuer Organismen in der Umwelt und damit auch über ihre möglichen Gefahren für die Umwelt und letztlich für den Menschen noch gering ist. Prognosen sind zum Teil noch unsicher, Fehlentscheidungen nicht auszuschließen. Diese Unsicherheit ist unter Umständen hinnehmbar, soweit die Fehler im nachhinein korrigierbar sind. Entscheidungen auf unsicherer Grundlage sind aber dort kaum verantwortbar, wo mögliche Fehlentscheidungen nicht wieder gut zu machen und die Folgen für Mensch und Umwelt schwerwiegend sind.

Welche Gesichtspunkte im einzelnen im Rahmen dieser Beurteilung bedeutsam und zu beachten sind, muß so weit wie möglich konkretisiert werden, um sowohl dem Antragsteller als auch der Behörde die Risikoabschätzung für die geplante Freisetzung zu ermöglichen und rein dezisionistische Fall-zu-Fall-Entscheidungen zu verhindern. In der Bundesrepublik sind z.Z. Wissenschaftler und Behörden in mehreren Gruppen dabei, solche Gesichtspunkte zusammenzustellen und damit auch eine wichtige Vorarbeit für künftige Regelungen zu leisten.

Vierte Unterfrage: Für welche Formen genetischer Veränderungen sollen die Regelungen gelten?

Die Genrichtlinien finden Anwendung nur auf Organismen, die mit den dort näher beschriebenen gentechnischen Methoden genetisch verändert worden sind. Andere Techniken der Veränderung von Erbmaterial bleiben damit ungeregelt, selbst wenn sie im Einzelfall unter Sicherheitsgesichtspunkten ähnlich zu bewerten sind.

Deshalb ist zu entscheiden, ob der Anwendungsbereich von Regelungen auf andere, vergleichbare Sachverhalte ausgedehnt werden soll. Andererseits ist aber auch zu bedenken, ob nicht definierbare Bereiche genetischer Veränderungen an Organismen, weil von ihnen Gefahren von vornherein nicht zu erwarten sind, aus dem Regelungsbereich oder doch zumindest aus dem Genehmigungsverfahren generell entlassen werden können. Für die nächsten Jahre wird mit einer großen Zahl von Freisetzungen gerechnet. Die Kapazität der zuständigen Behörden sollte nicht durch eine Vielzahl von Formalgenehmigungen letztlich unproblematischer Fälle gebunden werden. Im Interesse größerer Flexibilität sollte diese Konkretisierung des Anwendungsbereiches nicht im Gesetz selbst erfolgen.

4. Frage: Wer soll die Regelungen vollziehen?

Die Alternativen insoweit sind der Vollzug

- ausschließlich durch die Länder,
- durch die Länder mit Beteiligung einer zentralen Stelle des Bundes und
- grundsätzlich durch den Bund.

Ich gehe als selbstverständlich davon aus, daß auch ein Vollzug ausschließlich durch Länderbehörden auf einheitlicher materieller Grundlage zu erfolgen hätte. Diese Grundlage wäre ggf. durch eine Allgemeine Verwaltungsvorschrift zu schaffen. Aber auch dann wäre eine einheitliche Vollzugspraxis nicht leicht zu sichern. Außerdem sind Probleme zu erwarten, wenn eine Vielzahl dezentraler Behörden mit dem nötigen sachkundigen Personal ausgestattet werden muß.

Ländervollzug zur Gentechnik mit Beteiligung des Bundes zeichnet sich ab im Immissionsschutzrecht. Dort sollen nach den derzeitigen Vorstellungen die Länderbehörden durch Verwaltungsvorschrift verpflichtet werden, vor ihren Entscheidungen den sachverständigen Rat des Bundesgesundheitsamtes einzuhören (vgl. die Begründung zu Art. 2 des Entwurfs einer Verordnung zur Änderung der Verordnung zur Durchführung des Bundesimmissionsschutzes, BR-Drucks. 585/87 S. 36).

Das Bedürfnis nach bundeseinheitlicher Vollzugspraxis und die Schwierigkeit der zu beurteilenden Sachverhalte sprechen für einen Vollzug durch den Bund. Im Bundesgesundheitsamt stehen eine Organisationsstruktur und mit der ZKBS ein Sachverständigengremium schon bereit. Allerdings sind sowohl im Bundesgesundheitsamt als auch in der ZKBS im Hinblick auf die bislang noch nicht

praktisch gewordenen Freisetzungentscheidungen Veränderungen nötig. Außerdem ist gerade für Freisetzungentscheidungen wegen der Beurteilung zur Ökologie an die Beteiligung weiterer Behörden zu denken. Aufgabe der Länder wäre dann, die Einhaltung der von Bundesbehörden getroffenen Freisetzungentscheidungen vor Ort zu überwachen.

3. SCHLUSSBEMERKUNGEN

Daß es zur Gentechnik über die bereits bestehenden und sich abzeichnenden Regelungen (vgl. § 1 Nr. 10h AbwasserherkunftsV vom 3. Juli 1987, BGBl. I S. 1578 und die schon erwähnte Änderung im Immissionsschutzrecht) hinaus weitere gesetzliche Regelungen geben wird, ist kaum mehr zu bezweifeln. Über Form und Inhalt der Regelungen müssen aber einige auch grundsätzliche Entscheidungen erst noch getroffen werden. Ziel dieser Entscheidungen müßte sein, Risiken der Gentechnik auszuschließen und zugleich die Möglichkeit offen zu halten, die in der Entwicklung der Gentechnik liegenden Chancen zu nutzen. Wo nach diesen Kriterien der richtige Weg liegt, darüber wird z.Z. noch gestritten. Dennoch müssen Regelungen bald getroffen werden. Die Aufgabe des Gesetzgebers ist unter diesen Voraussetzungen nicht einfach.

Freisetzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen aus umwelthygienischer Sicht

E. Seeber

Seit längerer Zeit wird die Diskussion über das Risiko durch die Freisetzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen intensiv und teilweise recht kontrovers geführt. Durch Mangel an empirischen Daten sowie an Prüfungsverfahren und Bewertungskriterien haben diese Auseinandersetzungen bisweilen spekulativen Charakter. Besonders problematisch ist in einem solchen Fall freilich die Nutzen-Risiko-Beurteilung. Außerdem dürften die in der Gen-Richtlinie*) der Zentralkommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) benutzten Begriffsbestimmungen für Gesundheits- bzw. Umweltgefährdung, definiert als Nachweis einer übertragbaren Krankheit oder deren begründeten Verdacht, novellierungsbedürftig sein (Buchstabe D, Ziffer 3, Abs.3). Denn eine derartige Einengung des Schädlichkeitsbegriffes auf den Nachweis einer konkreten Gesundheitsgefahr entspricht - übertragen auf den Umweltschutz - weder den Leitlinien der Bundesregierung zur Umweltvorsorge noch dem Minimierungsgebot. Für den Hygieniker stellt die zu erwartende Freisetzung von Gentech-Mikroorganismen eine neue Variante einer anthropogenen Umweltkontamination dar. Im Hinblick auf die Vermehrungsfähigkeit von Gentech-Mikroorganismen in der Umwelt muß der Schädlichkeitsbegriff möglicherweise einer Revision unterzogen werden.

Für den Fall einer Freisetzung vermehrungsfähiger Mikroorganismen sollte eine Richtlinie - etwa analog EG-Entwurf DG 11 (EG-Draft XI/123/87-EN, Stand: 25.05.1987) - geschaffen werden mit den für die Abschätzung eines Umweltrisikos spezifischen Sicherheitskriterien. Dies ist aber erst möglich, wenn das Verhalten dieser Organismen in der Umwelt in vielerlei Hinsicht erforscht ist. Als wichtige Punkte - ohne Anspruch auf Vollständigkeit - seien hier genannt:

*) Bekanntmachung der Neufassung der Richtlinie zum Schutz vor Gefahren durch in-vitro neu kombinierte Nukleinsäuren vom 28. Mai 1986, 5. überarbeitete Fassung des Bundesministeriums für Forschung und Technik, Bonn 321-7221-2-7/86

- Pathogenitätsverhalten in der Umwelt,
- Gentransfer auf autochthone Mikroorganismen in der Umwelt,
- Resistenzverhalten und Wirtsspezifität in der Umwelt,
- Nachweisverfahren, nach Möglichkeit selektiv,
- Inaktivierungsverfahren.

Es bietet sich an, für diese Arbeiten Prüfmodelle zu erstellen. Schutzziele aus dem Blickwinkel der Umwelthygiene sind hier

- Trink- und Grundwasser,
- Abwasser und Oberflächengewässer,
- Boden und Abfall,
- Atmosphärenluft und Abluft.

Es wird allgemein anerkannt, daß auf diesen Gebieten ein großes Erkenntnisdefizit vorliegt*). Nach der Erarbeitung entsprechender Grundkenntnisse muß unmittelbar die nötige Sicherheitsforschung angeschlossen werden, da eine Ausbreitung von Mikroorganismen eine potentielle Gefahr für Mensch und Umwelt darstellt.

An die Seuchenausbreitung in früheren Zeiten - insbesondere über das Trinkwasser - sei nachdrücklich erinnert. Besonderes Augenmerk sollte daher dem Verhalten der freigesetzten Mikroorganismen gegenüber den Flockungs- und Filtrationsverfahren bei der Trinkwasseraufbereitung gewidmet werden; ebenfalls sehr wichtig ist die Klärung des Einflusses der oxidativen Trinkwasserdesinfektion. Im Abwasserbereich steht das Verhalten der Mikroorganismen in den Kläranlagen im Vordergrund und bei den Oberflächengewässern die mögliche Toxizität für Flora und Fauna (Fische, Muscheln).

Im Bereich Boden und Abfall ist primär das Versickerungsverhalten der freigesetzten Mikroorganismen zu klären. Hier ist die Art der Böden und Grundwasserleiter zu beachten, aber auch Parameter, die sich aus zusätzlichen Belastungen wie etwa Klärschlammabtragung oder Gülleeintrag ergeben.

Aus dem Luftbereich ist lediglich bekannt, daß Mikroorganismen durch Luftbewegungen transportiert werden können. Hier sollte man wissen, in welcher Weise Tröpfchen-Aerosole oder Stäube sich u.U. auf den Transport auswirken.

Für die Ausführung der skizzierten Aufgaben und die Umsetzung der Ergebnisse im Sinne der Umwelthygiene sollte ein leistungsfähiges Wissenschaftlergremium berufen werden; zwischen Ökologie und Umwelthygiene wäre hier zu differenzieren. Die Schaffung einer speziellen Freisetzung-Richtlinie unter besonderer Berücksichtigung umwelthygienischer Aspekte könnte zu einer Verminderung der Risiken bei gleichzeitiger Verbesserung der Chancen der Gentechnologie beitragen.

*) 1) Bericht der Enquête-Kommission "Chancen und Risiken der Gentechnologie", Januar 1987, BT-Drucksache 10/67775
2) Bericht des Umweltbundesamtes an den Bundesminister für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (1988)

Allgemeine Diskussion des zweiten Tages: Umwelthygienische und rechtliche Aspekte der Freisetzung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen und Viren

Buhk: Ich möchte kurz nochmal zusammenfassen, was wir zur Rekombination hier in den letzten zwei Tagen gehört haben. Es ist über Transformation, Transduktion und Konjugation gesprochen worden. Das alles sind natürliche Vorgänge, die der Rekombination von genetischem Material in der Tat dienen. Interessante Aspekte hierzu sind von Herrn Doerfler vorgetragen worden, der darstellte, daß Baculoviren und möglicherweise auch DNA, komplexiert mit Proteinen, grundsätzlich in Zellen, bis in die Zellkerne hinein, gelangen können. Sie können sich dort aufhalten, jedoch nicht vermehren. Weiterhin ist über die möglichen Risiken bei der Übertragung von genetischem Material in Organismen, die nicht Zielorganismen sind, gesprochen worden. Ziel der Gen-Richtlinien ist es u.a., die Rekombination von genetischem Material, die in vitro stattgefunden hat, zu begrenzen auf die Empfängerorganismen, für die sie geplant wurde. Nach den vorgetragenen Ergebnissen stellt sich jedoch die Frage, ob wir hier Dinge begrenzen wollen, die in der Natur schon sehr häufig vorkommen und es stellt sich die Frage, ob die z.Z. gültigen Richtlinien nicht schon wieder veraltet sind und unter diesen Aspekten neu überarbeitet werden müssen.

Ich will auch noch kurz auf den Begriff Freisetzung eingehen, der hier vielfältig benutzt wurde. Ich möchte zur Vereinfachung hier drei Bereiche unterscheiden. Frau Mahro erwähnte die Zahl von etwa 2×10^8 Organismen pro Tag, die aus einem Einzellaboratorium freigesetzt werden. Hier liegt jedoch nicht im eigentlichen Sinne eine Freisetzung vor, diesen Vorgang würde ich bezeichnen als ein "Ins-Freie-Gelangen". Daneben muß man bei "Freisetzung" unterscheiden zwischen Freilandexperimenten und Experimenten, die dazu dienen, Organismen nachhaltig in der Natur auszubringen, damit sie dort - lebensfähig und vermehrungsfähig - eine stabile Population bilden können. Letzteres steht im Gegensatz zu den vorgenannten Freilandexperimenten, bei denen man durch bestimmte Maßnahmen sicherstellen kann, daß eine solche Ausbreitung nicht passiert. Ähnliches gilt für das "Ins-Freie-Gelangen", wo es um Organismen geht, die sich in der Natur nicht etablieren können. Der kritischste Bereich ist sicherlich die nachhaltige Freisetzung.

Mahro: Ich will das nur noch einmal richtigstellen: Die Zahlen 10^8 bis 10^9 stammen aus einer amerikanischen Studie. Das Entweichen dieser Anzahl Bakterien pro Tag aus einem Labor der Sicherheitsstufe L1 soll gerade die Untergrenze des "Containment" definieren und da sehen Sie auch schon, wie hilflos man selbst in den USA, oder zumindest im Rahmen der EPA, im Moment noch ist, "Freisetzung" zu definieren. Man definiert Freisetzung als das Entweichen oder Freisetzen einer Bakterienanzahl, die größer ist als die Menge, die normalerweise aus einem L1-Labor "freigesetzt" wird und das sind nach Studien

und Schätzungen 10^8 bis 10^9 Mikroorganismen pro Tag. Klar ist, daß das nicht in dem Sinne "Freisetzung" ist, wie wir sie diskutieren.

Hahn: Ich arbeite im Bereich Gewässerschutz. Im Rahmen der Verwaltungsvorschriften zu § 7a des Wasserhaushaltsgesetzes werden sehr weitgehende Besorgnistatbestände hinsichtlich der Abwasserqualität geregelt. Auf Anregung des Instituts für Wasser-, Boden- und Lufthygiene wurde im Dezember 1986 in die Abwasserherkunftsverordnung der Bereich "Anwendung und Herstellung von in vitro neu kombinierten Mikroorganismen" aufgenommen. Die Herkunftsverordnung ist inzwischen in Kraft. Sie enthält die Herkunftsgebiete, in denen Abwässer nach dem "Stand der Technik" gereinigt werden müssen. Ausgehend von der Herkunftsverordnung ist der Entwurf einer Verwaltungsvorschrift entstanden, die alle Bundesländer verpflichten soll, die darin enthaltenen Randbedingungen umzusetzen. Die Gen-Richtlinie hat einen zu geringen Anwendungsbereich und erscheint nach dem momentanen Kenntnisstand nicht ausreichend, um auch die ökologischen und umwelthygienischen Aspekte abzudecken. Die zentrale Regelung in der Verwaltungsvorschrift ist die vollständige Inaktivierung aller gentechnisch veränderten Mikroorganismen im Abwasser, so z.B. Bakterien, Vektoren, Pilze, Algen und Zellen.

Für die Bereiche Lagerung und Transport wassergefährdender Stoffe, direkte Abwassereinleitung und Kühlwassereinleitung wird bei einer Kontamination die thermische oder chemische Inaktivierung vorgeschlagen. Die Maßnahme ist sehr restriktiv. Gleichzeitig ist in die Begründung der Verwaltungsvorschrift der Hinweis aufgenommen worden, daß beizureichendem Kenntnisstand auch schwächere Anforderungen erlassen werden können. Zur Zeit besteht dafür kein Anlaß. Auf der letzten Bund-Länder-Sitzung haben sich das Umweltministerium und alle 11 Länderministerien, die im Bereich der Wasserwirtschaft die Abwasserverwaltungsvorschriften inhaltlich gestalten, dafür ausgesprochen, diesen restriktiven Ansatz weiter zu verfolgen. Offen ist noch, wie die Maßnahmen im einzelnen technisch umzusetzen sind. Hier sind bestimmte Anforderungen in den Details (Chemikalien, Zeit, Temperatur) kombiniert. Zusätzlich enthält die Vorschrift die Anforderungen der ersten Abwasserverwaltungsvorschrift. In diesem Bereich sind Abläufe mit Biomassen in der Größenordnung von 30 g Trockenmasse pro Liter Wasser zu erwarten. Diese erheblichen Belastungen machen Begrenzungen für den chemischen Sauerstoffbedarf, den Phosphorgehalt und den Stickstoffgehalt erforderlich.

Die technische Anforderung bedeutet also im Klartext: Chemische oder thermische Inaktivierung und anschließend Reduzierung des Nährstoffgehalts in einer biologischen Reinigungsanlage. Eine kritische Anmerkung zu den Ausführungen, die Herr Schubert gemacht hat: Ich weiß nicht, ob das ein Versehen gewesen ist, aber Sie haben im Rahmen der Beurteilung durch die Zentralkommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) von den "Gefahren für Mensch und Gesundheit" gesprochen. Wir gehen darüber hinaus aber davon aus, daß die Gefahren, die im Umweltbereich auftreten können, grundsätzlich nicht kalkulierbar sind,

weder die artspezifischen Gefahren, noch die ortsbezogenen Gefahren, noch die zeitbezogenen Gefahren, noch die massenbezogenen Gefahren und auch nicht die spezifischen Populationsverhältnisse.

Wir können im Umweltbereich, auch hinsichtlich der Stoffe, heute noch nicht einmal die ökologischen Risiken relativ gut untersuchter Stoffe in dem erforderlichen Umfang abschätzen. Deshalb halten wir im Wasserbereich grundsätzlich möglichst alle Stoffe auf der Abwasserseite zurück; besonders dann, wenn diese mit technisch einfachen und ökonomisch vertretbaren Mitteln erkennbar sind.

Zur Euphorie im rechtlichen Regelungsbereich: Ich habe vor kurzem den hübschen Spruch gelesen, daß die Gentechnik der Evolutionssprung im rechtsfreien Raum ist. Ich befürchte, daß das stimmt und gehe nicht davon aus, daß das polizeiliche Ordnungsrecht über die Generalklausel zur Gefahrenabwehr hier greifen kann. Diese Klausel berücksichtigt den vorsorgenden Umweltschutz-Aspekt nicht. Ich glaube auch nicht, daß die freiwillige Selbstverpflichtung sich bewährt. Mir ist zum Beispiel nicht klar, welche Sanktionen hinter den Verstößen gegen die Auflagen stehen. Was passiert mit demjenigen, der auf der Grundlage freiwillige Selbstverpflichtung sich dann trotzdem bewußt oder unbewußt nicht an die Regelung hält? Dieser Bereich ist rechtlich nicht abgesichert. Es gibt darüber nur Schätzungen, wie groß die Zahl der Laboratorien in der Bundesrepublik ist, die sich tatsächlich mit solchen Untersuchungen beschäftigt.

Man kann auch daraus nicht schließen, daß die freiwillige Selbstverpflichtung sich bewährt hat. Wie will man das wissen, wenn man den Gesamtbereich prinzipiell gar nicht kennen kann. Es ist heute so, daß beispielsweise jeder von Ihnen in der Lage wäre - das Beispiel haben wir im eigenen Arbeitsbereich durchgeführt - die Algen einer bestimmten Species gentechnisch zum Leuchten zu bringen. Die Übertragung des Leuchtgens kostet 5000 \$. Das wird im Auftragsverfahren in den USA gemacht. Es gibt nicht die geringste Regelung, die Sie davon abhält, die Algen in ein Gewässer einzutragen. Das ist unabhängig davon, ob Sie vorher wissen, was dann passiert.

Schubert: Ich möchte klarstellen, daß es mir immer sowohl um den Schutz der menschlichen Gesundheit als auch der Umwelt ging. Wenn ich das in einer Passage nicht zum Ausdruck gebracht habe, dann tut mir das leid. Ich habe in der Tat auf die Genrichtlinien hingewiesen und darauf, daß wir bis jetzt keinen konkreten Anlaß haben, daran zu zweifeln, daß sie sich bewähren. Ich habe auch im Bereich der Freisetzung auf das Polizeirecht hingewiesen, habe aber gleichzeitig darauf hingewiesen, daß wir diese Regelungen für unzulänglich halten. Ich wollte darauf hinweisen, was es jetzt schon gibt und mir schien es auch richtig zu sagen, daß nach unseren bisherigen Erfahrungen die Industrie und auch die Wissenschaft sich an die Genrichtlinien halten. Es gibt bis jetzt noch sehr wenig Erkenntnisse darüber, wie sie sich im Hinblick auf die Freisetzung verhalten werden, weil es noch keinen einzigen Freisetzungsfall nach

unseren Kenntnissen in der Bundesrepublik gibt. Es gibt aber schon einige Anfragen an das Bundesgesundheitsamt, und vielleicht kann Herr Buhk dazu noch etwas sagen. Die Voranfragen zeigen doch, daß diejenigen, die so etwas vorhaben, die Richtlinien kennen und bereit sind, sich danach zu richten. Ich habe auch ausdrücklich gesagt, es müsse eine Regelung geschaffen werden, die notfalls auch durchsetzbar ist.

Weber (Hamburg): Mich belustigt natürlich die Vorstellung, daß jemand die Polizei anruft und sagt: Kommen sie mal ganz schnell, da hat eben einer E.coli K12 freigesetzt. Hat es eine Anfrage gegeben auf Freisetzung oder eine Voranfrage? Soweit ich weiß nur Voranfragen, keine Anfragen.

Buhk: Wenn ich richtig informiert bin, gibt es bisher nur Voranfragen. Es gibt Anfragen dahingehend, welche Punkte beantwortet werden müssen, wenn man eine Freisetzung beantragen will und was die Voraussetzungen sind. Dabei ging es bislang um Pflanzen.

Seeber: Nach meiner Auffassung sind für die Technikfolgeabschätzungen künftiger Freisetzungsexperimente zusätzliche Merkmale festzulegen bzw. Prüfkriterien zu erarbeiten, etwa vergleichbar den "Points to consider" der EPA. Ohne solche Vorarbeiten ist eine Risikobewertung für die Umwelt nicht möglich. Aus der Vergangenheit seien beispielsweise "die Handvol!" mikrobiologischer Parameter aus der Trinkwasserhygiene genannt, deren Festlegung viele Jahre in Anspruch genommen hat, die aber heute für den Vollzug der Trinkwasser-Verordnung die wesentlichsten seuchenhygienischen Bewertungskriterien darstellen. Im Verlauf der Anwendung künftiger Bio- und Gentechnologien im Freiland, insbesondere bei deren Massenausbringung, wird die Grund- und Trinkwasserhygiene erneut auf den Prüfstand gestellt werden. Die Folgeabschätzung künftiger Freisetzungsexperimente bzw. deren kommerzielle Anwendung sollte daher schon jetzt den Wasserkreislauf in die Sicherheitsforschung einbeziehen. Das von der Enquente-Kommission "Chancen und Risiken der Gentechnologie" aufgestellte Moratorium eines 5-Jahres-Freisetzungsverbotes muß genutzt werden, um geeignete Prüfparameter und Prüfmodelle zu entwickeln. Die umwelthygienischen Erkenntnisse und Forderungen der Bundesrepublik sollten dann auch auf EG-Ebene vertreten werden; denn im internationalen Sicherheitskonzept sind die Aspekte der Umwelthygiene bisher kaum vertreten. Schließlich habe ich noch eine gewisse Kritik am EG-Richtlinienverfahren auszusprechen: Es wundert den Hygieniker in hohem Maße, mit welcher Akribie und welchem Formalismus ein Anmelde- bzw. Zulassungsverfahren festgeschrieben wird, dessen Bewertungskriterien noch gar nicht bekannt sind. Auch die vorgesehenen Bearbeitungsfristen von 90 Tagen sind illusorisch, solange weder Prüfmethoden noch Prüfkriterien für eine Risikoabschätzung bekannt bzw. erarbeitet sind. Vor einer formalen Gleichstellung vermehrungsfähiger Mikroorganismen mit überwiegend abiotischen Arzneimitteln, wie es zur Zeit gehandhabt wird, kann der Hygieniker nur warnen. Im Gegensatz zum umfangreichen Kenntnisstand einer etwa 100-jährigen Arzneimittelforschung bzw. -anwendung, die eine rechtlich-formale Re-

gelung zuläßt, existiert für Fragen einer Risikobewertung bei der Freisetzung vermehrungsfähiger Mikroorganismen nur sehr bescheidenes empirisches Wissen. Dieser Unterschied könnte bei einem forcierten Regelungsbegehren im Freisetzungsbereich zur Festlegung von Schein-Sicherheiten führen; fatale Auswirkungen könnten die Folge sein.

Weber (Hamburg): Ist es schlimm, wenn wir dieses 5-Jahres-Moratorium einhalten? Natürlich in einer Weise einhalten, daß wir versuchen, offene Fragen zu beantworten. Ich möchte allerdings unbedingt Lebendimpfstoffe ausschließen, die vielleicht etwas ganz Positives bewirken können. Wenn es jemandem gelingen sollte, eine Lebendvakzine gegen AIDS zu finden, dann sollte natürlich diese nicht unter das Moratorium fallen.

Frommer: Sie haben das Stichwort zu der Beurteilung dieser Frage gegeben: Sie sagen, Freisetzung-Moratorium ist gut, aber nicht um jeden Preis. Genau da sollten wir eigentlich einhaken. Sicher sollten wir nicht generell sagen, daß alles ungefährlich ist, aber was wir innerhalb dieser 5 Jahresfrist tun sollten, ist sehr sorgfältig prüfen, wo wirklich sensible Bereiche sind und wo uns mindestens auf den ersten Blick der Nutzen erheblich höher erscheint als das evtl. Risiko. Ihr Beispiel mit einer AIDS-Vakzine ist richtig. Im Falle einer solchen Vakzine könnten wir nicht 5 Jahre warten. Insofern ist eine Zahl von 5 hier willkürlich und meiner Ansicht nach unsinnig. Die Frage ist doch eigentlich - und ich freue mich als Biologe, daß die Ökologie endlich einen Stellenwert bekommt, der ihr meiner Ansicht nach zukommt - tun wir mit der Anwendung von Transformation oder Konjugation wirklich etwas Neues?, wo tun wir etwas Neues?, machen wir wirklich Dinge, die es vorher nicht gab? Hier ist man doch gerade auch seit dem Bericht der EG-Kommission international erheblich weiter gekommen. Die OECD hat in der Zwischenzeit ihren Bericht auch publiziert. Das heißt, wir haben hier zwei wissenschaftlich-rechtlich anerkannte Papiere, die hier die Entwicklung weiter forschreiben. Das ist auch ein Grund zu überlegen, ob wir in der Bundesrepublik abseits stehen und fünf Jahre warten können; ich glaube, wir würden wissenschaftlich ins Hintertreffen geraten.

Weber (Hamburg): Wenn wir nicht über Lebendvakzine reden, wo sehen Sie die Notwendigkeit, Bakterien und Viren in nächster Zeit freizusetzen?

Frommer: Ich sehe im Moment keinen Fall, der in diesem Jahr noch beantragt werden muß. Ich könnte mir vorstellen, daß man hier eine Chance hat und deswegen habe ich die Frage gestellt, inwieweit wir von der Natur abweichen. Wir sollten überlegen, ob wir das Rüstzeug, das heute morgen hier diskutiert wurde, nicht auch anwenden können, um ganz dringende ökologische Probleme (Altlasten) anzugehen.

Hahn: Die Frage danach, was wir anders machen als die Natur, ist ein häufiges Argument in dieser Diskussion. Ich frage mich, um in einen anderen Technikbereich zu gehen: Was haben wir im Bereich der Kerntechnik anderes gemacht als das Natururan ein bißchen anzureichern? Wir haben wirklich nichts anderes gemacht, es ist lediglich ein Anreicherungsverfahren. Die Risiken im

Kernkraftbereich sind - zumindest in ihren Grundprinzipien - kalkulierbar. Bei der Gentechnik sind sie nicht kalkulierbar, zumindest die ökologischen Risiken nicht. Es gibt hier ein anderes Schutzziel als das immer wieder vorgestellte, im Seuchengesetz oder in der Genrichtlinie angesprochene Schutzziel "Mensch und menschliche Gesundheit". Die Risiken sind hier nicht kalkulierbar und es ist nicht verständlich, warum in dieser Hast - 5 Jahre oder 8 Jahre oder 3 Jahre - versucht wird, die Freisetzung zu beschleunigen. Wenn ich auf der anderen Seite sehe, wie grundsätzliche ökologische Zusammenhänge im amerikanischen Biosphere-2-Model untersucht werden, mit welchem Aufwand hier gearbeitet wird, ohne daß es sich um gentechnisch veränderte Organismen handelt, dann wäre es doch angebracht, für den Bereich der Gentechnik einen ausreichenden Untersuchungszeitraum zu haben, um die Risiken zumindest stichpunktartig abschätzen zu können. Man tut der gesamten Technik einen Bärendienst, wenn man einen nicht kalkulierten Risikofall mit Mikroorganismen, die grundsätzlich nicht rückholbar sind, übersieht. Ich glaube, ein Rückschlag der wissenschaftlichen Entwicklung im Bereich der Gentechnik würde erheblich sein, nicht nur in der Bundesrepublik Deutschland.

Weber (Hamburg): Ich möchte gern ein weiteres Argument für etwas mehr Langsamkeit einbringen. Ich glaube, es gibt sehr viele positive Möglichkeiten der Gentechnik auf sehr vielen Feldern. Aber wir haben ein Akzeptanzproblem, und wir müssen darauf achten, daß wir nicht die Chance der Akzeptanz größerer Dinge durch die Problematik untergeordneter Fragen verspielen.

König (Hoechst AG): Bei der Freisetzung ist es doch so, daß wir bewußt in Kauf nehmen, daß Organismen freigesetzt werden, die durchaus eine gewisse Zeit persistieren sollen, seien es Viren oder Bakterien. Bei industriellen Projekten ist es ja meistens so, daß Mikroorganismen verwendet werden, die bewußt attenuiert sind, etwa Colibakterien oder andere Organismen, die eben geschwächt sind und keine dauerhafte Persistenz haben. Man verwendet hier bewußt Plasmide oder Vektoren, die möglichst nicht transferierbar sind und die möglichst auch nicht mehr mobilisierbar sind. Man sollte etwas differenzieren. Im Abwasserhaushaltsgesetz wird gesagt, daß Abwässer aus den gentechnologischen Produktionen grundsätzlich gefährlich seien. In den USA und in England kommt es darauf an, welche Überlebensfähigkeit, welche Transformierbarkeit bei Vektoren vorhanden ist. Es ist z.B. so, daß in USA mittlerweile E.coli-Bakterien, die Insulin produzieren, als L 0 eingestuft werden, d.h. dort werden keine technischen Maßnahmen mehr vorgesehen, die eine Freisetzung verhindern sollen. Das ist so, weil man der Meinung ist, daß davon keine Gefährdung ausgeht. Und deswegen ist dort auch eine Abtötung oder eine prinzipielle Nachbehandlung von Abwässern nicht mehr vorgesehen. Bei uns geht man offensichtlich momentan einen anderen Gedankenweg, was ich nicht unbedingt für begründet halte.

Hahn: Bei der Abwasserfrage ist es so, daß im Wasserhaushaltsgesetz die Regelung genau umgekehrt erfolgt, aus Unwissen. Kurz gefaßt: Wir wissen,

daß wir nichts wissen! Sobald wir aber mit den Regelungen anfangen, vergessen wir das immer wieder. Wir gehen dann von Prämissen aus, die nicht geklärt sind. Wir haben uns im Wasserhaushaltsgesetz die Frage gestellt: Kennen wir die Zeitunterschiede zwischen der Ausbringung und der ökologischen Relevanz? Antwort: nein! Kennen wir ortsspezifische, also habitatbezogene Unterschiede in bezug auf die Ausbringung? Antwort: nein! Kennen wir massenbezogene Unterschiede in bezug auf Ausbringung? Antwort: nein! Kennen wir die spezielle Populationsdynamik? Antwort: nein! Kennen wir eine Analytik, mit der wir auch den Gentransfer in der Umwelt nachvollziehen können? Antwort: nein! Kennen wir die Metabolitensituation und ihre Auswirkung auf das ökologische System? Antwort: nein! Kennen wir die Synergismen der Metaboliten und deren Metabolitenantagonismen und Synergismen? Antwort: nein! Wir kennen praktisch überhaupt nichts. Es ist deshalb unter dem Gesichtspunkt des vorsorgenden Gewässerschutzes sinnvoll, technische Regelungen auf der sicheren Seite durchzuführen, besonders wenn sie leicht einhaltbar und auch ökonomisch zumutbar sind. Selbst wenn es 24 Länder gäbe, müßte man diese Kriterien - vielleicht nach diesem Anforderungskatalog - einmal prüfen. Ich meine, daß man bei der Bewertung von Risiken das Schadensausmaß und die Eintrittswahrscheinlichkeit kennen müßte. Beides kennt man in diesem Fall nicht und deshalb sollte man bei der unbeabsichtigten Freisetzung auf die sichere Seite gehen, ohne in einer Differenzierungsarithmetik zu verschwinden, die dann keiner mehr nachvollziehen kann.

Lopez Pila: Frage an Frau Mahro und Herrn Schubert: Wenn Sie die in den USA bestehende und die zukünftige EG-Gesamteuropäische Regelung vergleichen, fallen Ihnen Defizite der zukünftigen Europäischen Regelung im Vergleich zu der USA auf, und wenn ja welche?

Mahro: Wenn sich das Regelungskonzept, das sich auf EG- und auf Bundesebene abzeichnet, etwa so durchsetzt, dann gibt es keine Defizite gegenüber der amerikanischen Regelungssituation bezogen auf die Freisetzung. Es wäre wieder einmal so, daß Europa und die Bundesrepublik nachvollziehen, was uns in einem relativ langwierigen Prozeß schon in den USA vorexerziert worden ist. Dennoch wäre das für mich nicht ausreichend, weil auch die amerikanische Regelungssituation mir nicht ausreichend erscheint. Zwar muß man sagen, daß in den USA das Verwaltungsverfahren sehr viel transparenter gestaltet ist, daß man dort die Möglichkeit hat, auch Vorsorgepflichten des Staates einzuklagen, ohne unmittelbar Betroffener zu sein. Insofern hat das amerikanische System einen Vorteil. Beide Systeme haben aber den erheblichen Nachteil, daß man beschränkt ist auf die Entwicklung technischer Maßstäbe. Es wurde kein juristischer Maßstab entwickelt. Es handelt sich hier eben auch um politisch und sozial zu bewertende Angelegenheiten, die eigentlich nur im Gesetz durch mehr als nur bestimmte Rechtsbegriffe des allgemeinen Vorsorgegebotes geregelt werden müßten. Dort sehe ich die Schwachstelle. Juristen haben die Aufgabe, politisch - also auf der Basis einer demokratischen Meinungsbildung - die Begren-

zungslinie zwischen akzeptablen Risiken und Risiken, die wir nicht akzeptieren wollen, in rechtliche Regelungen zu fassen. Ob es sinnvoll wäre, in der Bundesrepublik einen öffentlichen Diskurs über Risikoprobleme anzustreben, ist sicherlich eine schwierige Frage.

Schubert: Ich beneide Herrn Hahn, der so konkret über das Wasserhaushaltsgesetz reden kann. Von mir wird erwartet, daß ich allgemeine Ausführungen über die Aufgaben des Staates und seine Daseinsberechtigung mache. Das ist natürlich nicht ganz so einfach, aber ich tue mein Bestes. Zuerst zu Ihrer Frage, Herr Lopez. Ich beantworte diese auch nur mit Unbehagen, weil ich zum Teil spekulieren muß und das tue ich ungern. Wenn man den gegenwärtigen Stand vergleicht, dann ist in den USA das rechtliche Instrumentarium in höherem Maße vorhanden als in Europa. Vergleicht man die Tendenzen innerhalb der EG, dann sind jedoch diese in der Bundesrepublik strenger als in den übrigen Staaten. Zur Frage der Forschung: Es ist zu Recht darauf hingewiesen worden, daß man die Zeit nutzen muß, um Erkenntnisse zu gewinnen. Das unterstützt die Bundesregierung auch. Der Bericht der EG-Kommission, auf den man sich immer bezieht, sieht grundsätzlich ein Verbot der Freisetzung von Mikroorganismen und Viren vor und diesem Verbot fügt er jeweils einen Katalog von Ausnahmen an, die vom Gesetzgeber festgelegt werden sollen. Die Alternative ist, daß man grundsätzlich verbietet, allerdings mit Erlaubnisvorbehalt, und diese Ausnahmемöglichkeiten der Exekutive überläßt. Das setzt natürlich voraus, daß man der Exekutive Kriterien an die Hand gibt, daß man sie mit dem nötigen Sachverstand ausstattet und daß man ihr auch das nötige Vertrauen innerhalb der Gemeinschaft entgegenbringt. Inwieweit das gelingt, muß man abwarten. Jedenfalls sind das die Alternativen, und diese liegen möglicherweise gar nicht so weit auseinander. Der Unterschied ist nur, daß einmal die Ausnahmen auf der Ebene des Gesetzes festgelegt werden und dann entsprechend schwer zu korrigieren, zu ergänzen oder zu reduzieren sind; im anderen Fall werden sie der Exekutive überlassen. Was sind die Aufgaben des Staates in diesem Zusammenhang? Diese sind natürlich zahlreich. Beispielsweise: Welche Kriterien könnten zugrundegelegt werden bei Entscheidungen über die Freisetzung? Ob diese Kriterien vom Gesetzgeber selber benannt werden oder ob er sie der Exekutive überläßt, ist in der Tat ein großes Problem. Da ist einmal der reine Gesundheits- und Umweltschutz, also Sicherheit im engeren Sinne, dann ist da die Frage des sozialen Friedens, nämlich die Frage des Schutzes der Arbeitsplätze. Dann kommt die Frage nach Nutzen und Risiken bzw. Chancen und Risiken. Der Staat - so meine ich - verfehlt sein Ziel auch, wenn er nur darauf sieht, mögliche Gefahren auszuschließen und damit auch gleichzeitig verhindert, daß Nutzen gewonnen wird.

Johannsen (Behringwerke): Ich möchte gerne noch einmal auf den Begriff der Relativierung von Risiken eingehen. Herr Hahn hat den Bezug hergestellt zwischen Gentechnologie und Kernenergie; ich finde diese Relativierung nicht zulässig, weil sie die Ängste der Bevölkerung unzulässig erhöht. Ich möchte

eine andere Relativierung herbeiführen, die wir seit vielen Jahren kennen. Der Polioimpfstoff ist ein Beispiel, das uns gezeigt hat, daß man mit zunächst einmal unübersehbaren Risiken durchaus arbeiten kann. Wir wissen, daß der Lebendimpfstoff gegen Polio, wenn er verbreitet wird, sich im Darm etwa für 100 Tage vermehrt. Das Virus unterliegt dabei bestimmten Veränderungen und wird wieder pathogen für den Menschen. Das sind die berühmten Fälle, bei denen die Kontaktpersonen infiziert werden können. Dennoch hat die Impfung praktisch dazu geführt, daß das Krankheitsbild in Deutschland verschwunden ist. Und wenn wir über Relativierung sprechen, dann muß man wirklich sehen, was wir heute machen und auch sehen, was wir heute planen. Der Polio-Impfstoff gibt uns hier einige Anhaltspunkte.

Lopez Pila: Polio wird durch den Wirt nicht wieder neuropathogen; es bildet sich nur eine Verschiebung zu mehr Neuropathogenität hin. Ich möchte nicht, daß jemand mit der Vorstellung nach Hause geht: Wenn ich mit einem Impfling in Kontakt komme, bin ich akut gefährdet. Das ist nicht der Fall.

Weber: Zur Sicherheitsforschung und den Mitteln dafür kann ich nur sagen: Der Bundesminister für Forschung und Technologie hat sich zwei Jahre lang intensiv bemüht um Forschungsprojekte und um Wissenschaftler, die Sicherheitsforschung machen. Inzwischen ist das ein wenig angelaufen; Sicherheitsforschung ist ein problematischer Wissenschaftsbereich. Zunächst war auch unklar, welche Fragen eigentlich zu stellen sind. Ich könnte mir vorstellen, wir bauen ein sehr großes Gewächshaus, was bakterien- und virendicht ist, und darin könnten sich Bäume und Büsche, aber auch Kaninchen und Vögel sowie Wasser und Bäche befinden. Das wäre - glaube ich - ein gutes Experimentierfeld.

Ich denke, gleichgültig wie wir zu den Risiken der Gentechnologie stehen, es hat sich gezeigt, daß wir in der Lage sind, miteinander zu sprechen. Den Schlüssel zu einem Konsens sehe ich darin, mit Augenmaß den Nutzen gegen die Risiken abzuwägen. Ich meine, daß das im Einzelfall durchaus möglich ist, jedoch eine verallgemeinernde Diskussion nur bis zu einem gewissen Punkt durchgeführt werden kann. Den Autoren der Beiträge sei für das hohe Niveau ihrer Ausführungen gedankt und die Diskutanten seien gelobt für ihre Fairneß und ihr Engagement.

Autorenverzeichnis

Allen, Dr. C.J.
National Environmental Research Council
Institute of Virology
Mansfield Road, Oxford OX1 3SR, GB

Bishop, Dr. D.H.L.
National Environmental Research Council
Institute of Virology
Mansfield Road, Oxford OX1 3SR, GB

Botzenhart, Prof. Dr. K.
Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Silcherstr. 7, 7400 Tübingen

Cameron, Dr. I.R.
National Environmental Research Council
Institute of Virology
Mansfield Road, Oxford OX1 3SR, GB

Dwyer, Dr. D.
Centre Medicale Universitaire
Biochimie Medicale
9, Avenue de Champel, CH - 1211 Genf 4

Doerfler, Prof. Dr. W.
Institut für Genetik, Universität Köln
Weyertal 121, 5000 Köln 1

Dotan, Dr. A.
Division of Human Environmental Sciences
Graduate School of Applied Science and Technology
The Hebrew University
P.O.P. 1255, Jerusalem 91904, Israel

Fattal, Dr. B.
Division of Human Environmental Sciences
Graduate School of Applied Science and Technology
The Hebrew University
P.O.B. 1255, Jerusalem 91904, Israel

Flehmig, Dr. B.
Hygiene Institut der Universität Tübingen
Silcherstr. 7, 7400 Tübingen

Guyer, S.
Institut für Hygiene u. Medizinische Mikrobiologie
Friedbühlstr. 51, CH - 3011 Bern

Habermehl, Prof. Dr., K. O.
Inst. f. klinische u. experimentelle
Virologie der FU Berlin
Hindenburgdamm 27, 1000 Berlin 45

Hahn, Dr. T.
Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Silcherstr. 7, 7400 Tübingen

Herbold, Dr. K.
Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Silcherstr. 7, 7400 Tübingen

Hooper, Dr. S.W.
Centre Medicale Universitaire
Biochimie Medicale
9, Avenue de Champel, CH - 1211 Genf 4

Huber, Dr. J.
Biologische Bundesanstalt f. Land- und
Forstwirtschaft
Institut f. biologische Schädlingsbekämpfung
Heinrichstr. 243, 6100 Darmstadt

Karst, Dr. M.
Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Silcherstr. 7, 7400 Tübingen

König, Dr. R.
Biologische Bundesanstalt f. Land- und
Forstwirtschaft
Institut f. Viruskrankheiten der Pflanzen
Messeweg 11-12, 3300 Braunschweig

Krumme, Dr. M.L.
Gesellschaft f. Biotechnologische Forschung
3300 Braunschweig, W. Germany

Lesemann, Dr. D.
Biologische Bundesanstalt f. Land- und
Forstwirtschaft
Institut f. Viruskrankheiten der Pflanzen
Messerweg 11-12, 3300 Braunschweig

Linton, Prof. Dr. A.
University of Bristol,
Department of Microbiology, Medical School
University Walk, Bristol BS8 1TD, GB

Mahnel, Prof. Dr. H.
Inst. f. medizinische Mikrobiologie,
Infektions - u. Seuchenmedizin
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
Veterinärstr. 13, 8000 München 22

Mahro, Dr. G.
Universität Bremen
2800 Bremen

Papari, Dr. L.
Division of Human Environmental Science
Graduate School of Applied Science and Technology
The Hebrew University
P.O.P. 1255, Jerusalem 91904, Israel

Possee, Dr. R.D.
National Environmental Research Council
Institute of Virology
Mansfield Road, Oxford OX1 3SR, GB

Ramos, Dr. J.L.
Estacion Exp. Zaidin,
Granada Espana

Reineke, Prof. Dr. W.
Bergische Universität
Fachbereich 9
Gesamthochschule Wuppertal
5600 Wuppertal 1

Rojo, Dr. F.
Centro de Biología Molecular
U.A.M. Madrid, Espana

Schubert, Dr. G.
Bundesministerium f. Jugend, Familie,
Frauen und Gesundheit
Deutschherrenufer 87, 5300 Bonn 2

Schwyzer, Dr. M.
Institut f. Virologie der Univ. Zürich
Winterthurerstr. 266a, CH - 8057 Zürich

Shuval, Prof. Dr. H.I.
Division of Human Environmental Sciences
Graduate School of Applied Science and Technology
The Hebrew University
P.O.B. 1255, Jerusalem 91904, Israel

Spillmann, Dr. S.K.
Medica, Medizinische Laboratorien
CH - 8028 Zürich

Tchorsh, Dr. Y.
Division of Human Environmental Sciences
Graduate School of Applied Science and Technology
The Hebrew University
P.O.P. 1255, Jerusalem 91904, Israel

Timmis, Prof. Dr. K.
Biochimie Medical
Centre Medicale Universitaire
9, Avenue de Champel, CH - 1211 Genf 4

Toulianidou, Dr. D.
Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Silcherstr. 7, 7400 Tübingen

Traub, Dr. F.
Gesundheitsamt der Stadt St. Gallen
CH - 9001 St. Gallen

Walter, Dr. R.
Inst. Allgemein- und Kommunalhygiene
Universität Dresden, DDR

Wekerle, Dr. J.
Inst. f. Tiermedizin u. Tierhygiene
Universität Hohenheim
Garbenstr. 30, 7000 Stuttgart 70

Wyler, Prof. Dr. R.
Institut f. Virologie der Univ. Zürich
Winterthurerstr. 266a, CH - 8057 Zürich

Im Institut f. Wasser-, Boden- u. Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes,
Corrensplatz 1, 1000 Berlin 33 tätige Autoren

Dizer, Dr. H.
Lopez Pila, PD Dr. J.M.
Seeber, Dr. E.
Warnecke, Dipl.Biol. B.

Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene E.V.

Nr. 1*:	Stooff: Chemische und physikalisch-chemische Fragen der Wasserversorgung	
Nr. 2:	Meinck: Englisch-deutsche und deutsch-englische Fachausdrücke aus dem Gebiete der Wasserversorgung und Abwasserbeseitigung	7,00 DM
Nr. 3:	Kisker: Die Überwachung der Grundstückskläranlagen	0,50 DM
Nr. 4:	Kolkwitz: Ökologie der Saproben	5,00 DM
Nr. 5*:	Beger: Leitfaden der Trink- und Brauchwasserbiologie	
Nr. 6*:	Meinck/Stooff/Weldert/Kohlschütter: Industrie-Abwässer	
Nr. 7*:	Lüdemann: Die Giftwirkung des Mangans auf Fische, Krebse und Fischnährtiere	
Nr. 8:	Büsscher: Untersuchungen über den Aufwuchs in Wasserbecken und seine Bekämpfung mit Kupfersulfat	2,60 DM
Nr. 9:	Meinck/Thomaschk: Untersuchungen über den anaeroben Abbau von Viskoseschlamm	4,40 DM
Nr. 10:	Beyreis/Heller/Bursche: Beiträge zur Außenluft-hygiene	9,60 DM
Nr. 11:	Steinkohlenflugasche	15,00 DM
Nr. 12*:	Bethge/Löbner/Nehls/Kettner/Lahmann: Außenlufthygiene. 1. Folge	
Nr. 13*:	Bethge/Büsscher/Zinkernagel/Löbner: Außenlufthygiene. 2. Folge	
Nr. 14a*:	Kruse: Einheitliche Anforderungen an die Trinkwasserbeschaffenheit und Untersuchungsverfahren in Europa	
Nr. 14 b:	Einheitliche Anforderungen an die Beschaffenheit, Untersuchung und Beurteilung von Trinkwasser in Europa	8,60 DM
Nr. 15:	Löbner: Ergebnisse von Staubniederschlagsmessungen an verschiedenen Orten Deutschlands	2,00 DM
Nr. 16:	Naumann/Heller: Probleme der Verunreinigung von Grund- und Oberflächenwasser durch Mineralöle und Detergentien. Luftverunreinigung und Abhilfemaßnahmen	2,50 DM
Nr. 17:	Aurand/Delius/Schmier: Bestimmung der mit Niederschlag und Staub dem Boden zugeführten Radioaktivität (Tropfsammelverfahren)	4,00 DM

Nr. 18*:	Naumann: 60 Jahre Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene	
Nr. 19:	Abhandlungen aus dem Arbeitsgebiet des Instituts für Wasser-, Boden- und Lufthygiene	17,60 DM
Nr. 20:	Sattelmacher: Methämoglobinämie durch Nitrate im Trinkwasser	4,80 DM
Nr. 21:	Vorträge auf der Jahrestagung des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 1963 in Berlin	4,80 DM
Nr. 22:	Langer/Kettner: Vorträge auf der Jahrestagung des Vereins für Wasser-, Boden und Lufthygiene 1964 in Köln	5,10 DM
Nr. 23:	Lahmann: Luftverunreinigung in den Vereinigten Staaten von Amerika	5,60 DM
Nr. 24*:	Mauch: Bestimmungsliteratur für Wasserorganismen in mitteleuropäischen Gebieten	
Nr. 25:	Lahmann/Morgenstern/Grupinski: Schwefeldioxid-Immissionen im Raum Mannheim/Ludwigshafen	6,80 DM
Nr. 26:	Kempf/Lüdemann/Pflaum: Verschmutzung der Gewässer durch motorischen Betrieb, insbesondere durch Außenbordmotoren	8,50 DM
Nr. 27:	Neuzeitliche Wasser-, Boden- und Lufthygiene	10,80 DM
Nr. 28:	Lahmann: Untersuchungen über Luftverunreinigungen durch den Kraftverkehr	13,40 DM
Nr. 29:	Heller/Kettner: Forschungsarbeiten über Blei in der Luft und in Staubniederschlägen	11,60 DM
Nr. 30:	Meteorologie und Lufthygiene	19,80 DM
Nr. 31*:	Die Desinfektion von Trinkwasser	
Nr. 32:	Rattenbiologie und Rattenbekämpfung	29,40 DM
Nr. 33:	Beiträge aus dem Gebiet der Umwelthygiene	30,80 DM
Nr. 34:	Gewässer und Pestizide. 1. Fachgespräch	15,20 DM
Nr. 35:	Kettner: Geruchsbelästigende Stoffe	15,00 DM
Nr. 36:	Durchlässigkeit von Lockersedimenten – Methodik und Kritik	9,20 DM
Nr. 37:	Gewässer und Pflanzenschutzmittel. 2. Fachgespräch	27,40 DM
Nr. 38:	Umweltschutz und öffentlicher Gesundheitsdienst . . .	34,60 DM
Nr. 39:	Schadstoff-Normierung der Außenluft in der Sowjetunion – MIK-Werte und Schutzzonen 1972	4,60 DM
Nr. 40:	Hygienisch-toxikologische Bewertung von Trinkwasserinhaltsstoffen	21,50 DM

Nr. 41:	Lufthygiene 1974	26,00 DM
Nr. 42:	Immissionssituation durch den Kraftverkehr in der Bundesrepublik Deutschland	70,00 DM
Nr. 43*:	Schwimmbadhygiene (vgl. Nr. 58)	
Nr. 44:	Zur Diskussion über das Abwasserabgabengesetz . . .	18,00 DM
Nr. 45:	Siedlungshygiene und Stadtplanung	31,00 DM
Nr. 46:	Gewässer und Pflanzenschutzmittel. 3. Fachgespräch	32,00 DM
Nr. 47:	Dulson: Organisch-chemische Fremdstoffe in atmosphärischer Luft	28,00 DM
Nr. 48:	Chemisch-ökologische Untersuchungen über die Eutrophierung Berliner Gewässer unter besonderer Berücksichtigung der Phosphate und Borate	35,50 DM
	Mitglieder:	17,75 DM
Nr. 49:	Lahmann/Prescher: Luftverunreinigungen in der Umgebung von Flughäfen	33,50 DM
	Mitglieder:	16,75 DM
Nr. 50:	Oetting: Hydrogeochemische Laboruntersuchungen an Bergmaterialien und einer Hochofenschlacke	43,20 DM
	Mitglieder:	21,60 DM
Nr. 51:	Gewässer und Pflanzenbehandlungsmittel IV 4. Fachgespräch	28,50 DM
	Mitglieder:	14,25 DM
Nr. 52:	Aktuelle Fragen der Umwelthygiene	65,00 DM
	Mitglieder:	32,50 DM
Nr. 53:	Luftqualität in Innenräumen	69,50 DM
Nr. 54:	Limnologische Beurteilungsgrundlagen der Wasser- güte (Kolkwitz-Symposium)	12,50 DM
Nr. 55:	Atri: Schwermetalle und Wasserpflanzen	29,00 DM
Nr. 56:	Zellstoffabwasser und Umwelt	48,00 DM
Nr. 57:	Gewässerschutz - Abwassergrenzwerte, Bioteste, Maßnahmen	36,00 DM
Nr. 58:	Schwimmbadhygiene II	33,00 DM
Nr. 59:	Lufthygiene 1984	48,00 DM
Nr. 60:	Atri: Chlorierte Kohlenwasserstoffe in der Umwelt I . . .	58,00 DM
Nr. 61:	Figge/Klahn/Koch: Chemische Stoffe in Ökosystemen	48,00 DM
Nr. 62:	Chemical Water and Wastewater Treatment	60,00 DM
Nr. 63:	Humanökologie – Umwelt-, Innenraum- und Siedlungs- hygiene	38,00 DM

Nr. 64:	Boden- und Grundwasserschutz	46,00 DM
Nr. 65:	Umwelthygiene für Ärzte und Naturwissenschaftler . . .	78,00 DM
Nr. 66:	Atri: Chlorierte Kohlenwasserstoffe in der Umwelt II . .	65,00 DM
Nr. 67:	Luftverunreinigung durch Kraftfahrzeuge	48,00 DM
Nr. 68:	Grundwasserbeeinflussung durch Pflanzenschutzmittel	58,00 DM
Nr. 69:	Smogepisoden	58,00 DM
Nr. 70:	Atri: Chlorierte Kohlenwasserstoffe in der Umwelt IV . .	76,00 DM
Nr. 71:	Haaranalyse in der Medizin und Umwelt	48,00 DM
Nr. 72:	Legionellen	40,00 DM
Nr. 73:	Atri: Nickel – Elemente in der aquatischen Umwelt I . .	54,00 DM
Nr. 74:	Schwermetalle in der Umwelt	54,00 DM
Nr. 75:	Atri: Arsen – Elemente in der aquatischen Umwelt II . .	44,00 DM
Nr. 76:	Grenzwerte und Risikobetrachtungen in der Umwelt-hygiene	34,00 DM
Nr. 77:	Landwirtschaftliche Klärschlammverwertung . . . ca.	40,00 DM
Nr. 78:	Viren und Plasmide in der Umwelt	58,00 DM
Nr. 79:	Pflanzenschutzmittel und Grundwasser	78,00 DM
Nr. 80:	Biotechnologische In-situ-Sanierung kontaminierten Standorte	58,00 DM

Die genannten Veröffentlichungen können beim Gustav Fischer Verlag, Postfach 7201 43, D-7000 Stuttgart 70, bestellt werden.

Mit * gekennzeichnete Nummern sind vergriffen.

Vereinsmitglieder können die Veröffentlichungen beim Verein zu Vorzugspreisen erwerben.

Der gemeinnützige Verein fördert insbesondere die wissenschaftlichen Arbeiten des Instituts für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes.

Wer an Informationen über den Verein für Wasser-, Boden- und Lufthygiene E.V. interessiert ist oder Mitglied dieses Vereins werden möchte, wende sich bitte an den Geschäftsführer, Herrn Dipl.-Ing. H. Nobis-Wicherding, Telefon (030) 86 33-2707 (Anschrift: Verein für Wasser-, Boden- und Lufthygiene E.V., Corrensplatz 1, D-1000 Berlin 33).

ISBN 3-437-39589-1