

# **Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Institut für angewandte Mikrobiologie**  
Fachbereich 09 (Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement)

## **Untersuchungen an den Haltungsbedingungen von Blutegelein für medizinische Zwecke**

### **Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**Doktor der Agrarwissenschaft**

**(Dr. agr.)**

**Autor:** **Dipl. Ing. agr. Harald Thrassivoulos Galatis**  
**geboren am 22.12.1954 in Frankfurt am Main**

**Betreuung:** **Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer**  
**Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak**

**Ort, Abgabetermin:** **Gießen, im Januar 2017**

## Zusammenfassung

Das Fertigarzneimittel Blutegel wird in den letzten Jahren in Deutschland wieder vermehrt benötigt, der jährliche Bedarf liegt derzeit bei etwa 500.000 EgeIn. Dies betrifft die Arten *Hirudo medicinalis*, *Hirudo verbana* und *Hirudo orientalis*. Als Alternative zur bisher überwiegend praktizierten Verwendung von Blutegeln aus Wildfängen wird eine Versorgung aus Vermehrungsbetrieben angestrebt, was eine intensive Haltung bedingt. Sowohl der Tierschutz als auch die Wirtschaftlichkeit verlangen eine verlustarme Aufzucht. Das Lebensumfeld der Blutegel in solchen Betrieben wird hauptsächlich durch die Qualität des Haltungswassers bestimmt. Durch den Eintrag von Stoffwechselprodukten und Blut, dem Futtermittel für Blutegel, verändern sich chemische Wasserzusammensetzung und mikrobiologische Situation in ihrem Umfeld regelmäßig negativ für die Blutegel. Eine besondere Schwierigkeit resultiert aus den großen zeitlichen Abständen zwischen den Fütterungen. Bisher gab es keine systematischen Untersuchungen zum Einfluss intensiver Haltung auf die Blutegelgesundheit.

Für die vorgelegte Arbeit wurden zwei Haltungsanlagen mit sechs technisch unterschiedlichen Wasserbehandlungssystemen konstruiert, in der Biebertaler Blutegelzucht GmbH (bbez) aufgebaut und deren Eignung für die Blutegelhaltung untersucht. Auch wurde eine Analyse des bisher praktizierten Haltungsverfahrens durchgeführt, um Schwachstellen zu identifizieren. Eine Pilotanlage arbeitete mit fünf zirkulierenden Wasserbehandlungssystemen: je ein kleiner und großer biologischer Filter, durch Eichenextraktzugabe leicht saures Haltungswasser, Ozonisierung des zirkulierenden Wassers sowie eine kombinierte Hochfrequenz- und ultraviolette Lichtbestrahlung wurden eingesetzt. Die beiden Biofilter-Anlagen verhielten sich mikrobiologisch sehr ähnlich, in beiden stiegen die Abundanzen der kultivierbaren Bakterien nach der Fütterung kaum an. Auf etwas niedrigerem Niveau ähnlich war der Konzentrationsverlauf in der Eichenextrakt-Anlage. In den Anlagen mit der Ozonisierung sowie der Hochfrequenz- und UV-Bestrahlung sanken hingegen nach der Fütterung die Abundanzen der kultivierbaren Bakterien und verblieben auf dem niedrigeren Niveau. Die Zellzahlen hingegen verblieben bis zum Versuchsende auf einem leicht erhöhten Niveau, ein Beleg für Veränderungen in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft. In den Versuch einbezogen wurde eine Fütterung der Blutegel mit Blut. Die Konzentration der Stickstoffabbauprodukte erschien, insbesondere kurz nach der Fütterung, kurzzeitig jedoch zu hoch für ein gesundes Umfeld für Blutegel. Die Haltung der Blutegel im leicht sauren Milieu schien ihrer Gesundheit förderlich zu sein.

Zur tiefergehenden Untersuchung der Hinweise aus der Pilotanlage wurden in einer Haupt-Versuchsanlage drei Wasserbehandlungssysteme über einen Zeitraum von 15 Monaten eingesetzt. Drei Versuchsdurchgänge mit zwei Fütterungen lieferten Daten. Untersucht wurden zwei Anlagen mit leicht saurem Haltungswasser, eine Ansäuerung erfolgte mittels Eichenextrakt, eine zweite mittels Kohlendioxid in Umkehrosmosewasser, jeweils kombiniert mit einem biologischen Kanisterfilter. Eine dritte Anlage behandelte zirkulierendes Trinkwasser in einem Kanister- und einem Schwimmsandfilter. Verfahrenstechnische Mängel konnten in den beiden ersten Versuchsdurchgängen behoben werden. Die drei Systeme waren nach einer Anlaufzeit in der Lage, Ammonium und Nitrit zu oxidieren. Unmittelbar nach der Fütterung stiegen in allen Anlagen die Konzentrationen beider Stickstoffverbindungen drastisch, um dann nach kurzer Zeit wieder abzufallen. Die Nitratkonzentration stieg in allen Anlagen nach der Fütterung kontinuierlich und über einige Wochen an, fiel dann aber auch wieder ab, hier vollzogen sich An- und Abstieg über einen deutlich längeren Zeitraum. Kriterium zur Beurteilung der Leistung der Systeme waren in allen Versuchen die Anzahl der überlebenden Egel sowie ihr Wachstum.

Untersuchungen zeigten Effekte auf die Mikrobiologie im Haltungswasser. Die Blutfütterung führte in allen Anlagen zu erhöhter Konzentration wasserassoziierter Bakterien, die im dritten Durchgang erkennbar schwächer ausfiel. Die Verschiebungen in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften wurden genauer untersucht. *Flavobacterium* spp. war nach der Blutfütterung in der Anlage mit Eichenextraktzugabe nicht mehr nachweisbar, wogegen dessen Konzentration in den beiden anderen Anlagen leicht anstieg. *Chryseobacterium* spp. war in den Anlagen mit Eichenextrakt und mit dem Schwimmsandfilter nach der Fütterung in nur leicht erhöhter Konzentration nachweisbar, in dem angesäuerten Umkehrosmosewasser mit deutlich höherer Konzentration. Die Blutfütterung veränderte die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften. Bakterien der Gattungen *Cupriavidus*, *Variovorax*, *Comamonas*, *Bosea* und *Brevundimonas* waren nur vor der Fütterung, Bakterien der Gattungen *Tahibacter*, *Morganella*, *Aeromonas*, *Delftia*, *Aminobacter*, *Rhizobium*, *Pedobacter* und *Agrococcus* nur danach nachweisbar. Ein Zusammenhang mit den auftretenden Erkrankungen der Blutegel war zu vermuten. Ein positiver Effekt leicht sauren Haltungswassers auf die Egel ließ sich in der Haupt-Versuchsanlage nicht bestätigen.

Erkennbar war, dass die Kombination aus veränderter mikrobiologischer und chemischer Situation im Haltungswasser, verbunden mit häufigen Störungen der Blutegel, in der Verdauungsphase negativen Einfluss auf den Aufzuchterfolg hat. Die Bedeutung der chemischen Faktoren alleine wurde hingegen bisher überbewertet. Haltungssysteme mit zirkulierendem Wasser bie-

ten hingegen mehrere Vorteile. Neben der Dämpfung physikalischer und chemischer Änderungen und der Minimierung von Störungen der Tiere, sparen sie Ressourcen und können hygienisierende Technik integrieren. Angefütterte Schwimmsandfilter sind für die Blutegelaufzucht vorteilhaft. Wesentliche Erkenntnisse aus dieser Arbeit wurden in der bbez erfolgreich umgesetzt.

## Abstract

Leeches for therapeutic use are classified as a drug according to German drug law. The demand amounts to 500,000 leeches yearly. This number applies to the *Hirudo medicinalis*, *Hirudo verbana* and *Hirudo orientalis*. Leeches for therapeutic use are predominantly caught in their natural habitat. With the objective of providing more bred leeches for medicinal use, breeders are aiming to increase the number of leeches from leech farms where they are raised under thoroughly controlled conditions. The reasons for this are protection of the species, safe production of the medicinal leech as a drug, as well as supply security. The concentration of metabolic substances in the water and changes in the bacterial population alter the living conditions of the leeches in a way detrimental to health, vitality, growth, and fertility of raised leeches. To this day, there is no research analyzing the influence of keeping requirements under intensive cultivation conditions. For this thesis, two sites with recirculating water systems and six different water treatment systems were designed and assembled at Biebertaler Blutegelezucht (bbez) in order to test their ability to enhance water quality for leech raising. Existing leech keeping techniques were examined to identify weak points.

A pilot installation was set up with a large organic filter, reduction of water acidity achieved by adding oak extract, ozonation of circulating water, irradiation of circulating water with high frequency and ultraviolet light, and a commonly used organic canister filter. Both systems with organic filters had similar reactions, there being nearly no detectable reactions on blood feedings. Reaction to the system with oak extract was comparable as well, but at a lower level. However, the systems with hygienic technology (ozonation and irradiation) showed reduced abundance of cultivable bacteria and were able to maintain that level. In contrast, cell numbers remained at a slightly increased level, suggesting a change in the bacterial population. Keeping leeches under lightly acidic conditions (pH approximately 6,5) seemed to be useful for keeping them healthy. Based on the experience of the pilot installation, a second installation was designed to examine three water treatment systems. Because oak extract not only reduces pH of the water, but also adds several substances such as humins which might influence leeches, water was alternatively acidified by injecting CO<sub>2</sub> into reverse osmosis water. The third installation used a sand filter unit with floating sand. This principle test system was pursued over a period of 15 months during three trials wherein two feedings were executed. The most important criterion to evaluate efficiency of the water treatment systems was the rate of surviving leeches and their growth. The first two trials in this site revealed faults in technical designs, which were eliminated by the third trial. Ammonia and nitrite reduction was in working order in all of the systems but with a certain delay. After feeding, concentration of both nitrogen compounds rose

for a short period before subsiding. Concentration of nitrate rose continuously after blood feeding of the leeches, but eventually did decrease. The period of time in which this increase and decrease took place was noticeably longer.

Microbiological research revealed a strong impact of the water treatment on abundance and type of water-associated bacterial population. After blood feeding of the leeches, concentration of these bacteria rose in all three treatment systems. During the first trial, the increase was clearer than during the third trial. Shifts in the bacterial population were observed by examining *Flavobacterium* spp. und *Chryseobacterium* spp. The oak extract installation showed no detectable *Flavobacterium* spp. after leech feeding; in contrast, concentration of this bacteria rose slightly in both other installations. *Chryseobacterium* spp. increased in abundance just slightly in the installations with oak extract and sand filter unit, noticeably more so in the installation with CO<sub>2</sub> injection.

The composition of the bacterial population was highly influenced by the blood feeding. *Chryseobacterium* spp. were found only before feeding, whereas *Tahibacter*, *Morganella*, *Aeromonas*, *Delftia*, *Aminobacter*, *Rhizobium*, *Pedobacter* und *Agrococcus* were found only after feeding. A connection between these bacteria and health problems of the leeches can be assumed.

After the pilot trial, it was to be expected that keeping leeches under slightly acidic conditions would be beneficial; this supposition was not confirmed in the main trials.

Keeping leeches in systems with recirculating water has a number of advantages in comparison with systems based on changing the water. There is less change in the chemical and physical conditions of the water. There is a saving of resources and reduction in disturbance of the leeches, and furthermore, hygienic technologies can be integrated.

Water treatment systems adapted to leech needs are able to influence water quality, especially as related to blood feeding with the effect that more healthy leeches can be raised.

Overall results of the main trials showed that metabolic substances in the water combined with shifts in the composition of the bacterial population have a decisive effect on the success rate of raising leeches. It also demonstrates that the impact of nitrogen compounds was overrated. The implemented sand filter unit combined with previous feeding was capable of improving water quality with regard to leech needs.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	II
Abstract .....	V
Inhaltsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	X
Tabellenverzeichnis.....	XIII
Abkürzungsverzeichnis .....	XIV
1 Einleitung und Zielsetzung .....	1
1.1 Generelle Problemstellung.....	1
1.1.1 Die Blutegel.....	3
1.1.1.1 Systematische Einordnung der Blutegel.....	3
1.1.1.2 Anatomie der Blutegel.....	4
1.1.1.3 Verhalten der Blutegel, Nahrungsaufnahme und Fütterung .....	7
1.1.2 Rechtliche Rahmenbedingungen für das Arzneimittel Blutegel.....	11
1.1.3 Wirkweise der Blutegelsaliva in der Therapie.....	12
1.1.4 Versorgung des Marktes und wirtschaftliche Notwendigkeiten .....	13
1.2 Herstellungstechniken, Produktqualität .....	13
1.2.1 In der Literatur beschriebene Herstellverfahren .....	15
1.2.2 Haltungs- und Vermehrungsverfahren anderer Hersteller .....	16
1.2.3 Etabliertes Verfahren der Biebertaler Blutegelzucht (bbez).....	17
1.3 Analyse des Produktionsverfahrens.....	22
1.3.1 Analyse von Haltungsfaktoren und Verlustquellen .....	23
1.4 Methodischer Leitfaden und Hypothese .....	34
1.5 Zielsetzung.....	35
2 Material und Methoden.....	38
2.1.1 Aufbau der Pilotanlage, Fütterungen und Blutegel.....	38
2.1.1.1 EE-Anlage.....	41
2.1.1.2 Bio-Anlage.....	43
2.1.1.3 HF/UV-Anlage .....	44
2.1.1.4 O <sub>3</sub> -Anlage .....	45
2.1.1.5 Kontroll-Anlage .....	46
2.1.2 Messung physikalischer und chemischer Parameter.....	48
2.1.3 Messung der mikrobiologischen Wasserparameter .....	50
2.2 Haupt-Versuchsanlage für Fütterungsversuche .....	51
2.2.1 Aufbau der verbesserten Versuchsanlage .....	51
2.2.1.1 EE-Anlage.....	56

2.2.1.2	RO-Anlage.....	57
2.2.1.3	SB-Anlage.....	59
2.2.2	Messung chemischer und physikalischer Parameter.....	62
2.2.3	Messung der mikrobiologischen Wasserparameter .....	64
2.2.4	Bewertung der Effektivität der Wasserbehandlung anhand der Blutegel.....	67
3	Durchführung der Versuche und Ergebnisse .....	68
3.1	Durchführung und Ergebnisse der Versuche .....	68
3.1.1	Durchführung des Pilotversuchs .....	68
3.1.2	Ergebnisse zur Verfahrenstechnik im Pilotversuch .....	69
3.1.3	Ergebnisse chemischer Wasserqualität im Pilotversuch.....	70
3.1.3.1	EE-Anlage.....	70
3.1.3.2	Bio-Anlage.....	71
3.1.3.3	HF/UV-Anlage .....	72
3.1.3.4	O <sub>3</sub> -Anlage .....	73
3.1.3.5	Kontroll-Anlage.....	75
3.1.4	Ergebnisse mikrobiologische Untersuchungen des Wassers im Pilotversuch .....	79
3.1.4.1	EE-Anlage.....	79
3.1.4.2	Bio-Anlage.....	81
3.1.4.3	HF/UV-Anlage .....	82
3.1.4.4	O <sub>3</sub> -Anlage .....	83
3.1.4.5	Kontroll-Anlage.....	84
3.1.5	Verhalten der Blutegel im Pilotversuch.....	85
3.1.5.1	EE-Anlage.....	85
3.1.5.2	Bio-Anlage.....	85
3.1.5.3	HF/UV-Anlage .....	85
3.1.5.4	O <sub>3</sub> -Anlage .....	85
3.1.5.5	Kontroll-Anlage.....	86
3.1.6	Zusammenfassung der Ergebnisse Pilotversuch.....	87
3.1.7	Durchführung und Ergebnisse Fütterungsversuch 1.....	88
3.1.7.1	Durchführung Fütterungsversuch 1 .....	88
3.1.7.2	Ergebnisse Verfahrenstechnik Fütterungsversuch 1 .....	89
3.1.7.3	Ergebnisse zur chemischen Wasserqualität im Fütterungsversuch 1.....	91
3.1.7.4	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen Fütterungsversuch 1 .....	94
3.1.7.5	Sterberaten und Gewichte der Blutegel in Fütterungsversuch 1.....	109
3.1.7.6	Zusammenfassung der Ergebnisse Fütterungsversuch 1 .....	112
3.1.8	Modifizierte Fütterungsversuche 2 und 3 .....	114
3.1.8.1	Durchführung des Fütterungsversuchs 2 .....	115
3.1.8.2	Durchführung und Ergebnisse des Fütterungsversuchs 3.....	115
3.1.8.3	Ergebnisse zur Verfahrenstechnik in Fütterungsversuch 3.....	116

---

3.1.8.4	Ergebnisse zur Chemischen Wasserqualität in Fütterungsversuch 3 .....	117
3.1.8.5	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen Fütterungsversuch 3 .....	121
3.1.8.6	Sterberaten und Gewichte der Bluteigel in Fütterungsversuch 3.....	128
3.1.8.7	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Fütterungsversuch 3 .....	138
4	Diskussion.....	140
5	Anhang.....	150
	Literaturverzeichnis.....	158
	Eidesstattliche Erklärung.....	165

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Organisationsschema des Bluteigel.....	5
Abbildung 2:	Überlebensrate der drei Arten <i>Hirudo orientalis</i> , <i>H. medicinalis</i> , und <i>H. verbana</i> unter künstlichen Haltungsbedingungen. ....	22
Abbildung 3:	Cluster aus Bluteigeln.....	24
Abbildung 4:	Teilansicht der Pilotanlage .....	40
Abbildung 5:	Hydraulisches Schema der EE-Anlage, Pilotversuch.....	42
Abbildung 6:	Hydraulisches Schema der Bio-Anlage, Pilotversuch.....	43
Abbildung 7:	Hydraulisches Schema der HF/UV-Anlage, Pilotversuch.....	44
Abbildung 8:	Hydraulisches Schema der O <sub>3</sub> -Anlage, Pilotversuch .....	45
Abbildung 9:	Hydraulisches Schema der Kontroll-Anlage, Pilotversuch .....	46
Abbildung 10:	Teilansicht der Haupt-Versuchanlage für Fütterungsversuche 1 bis 3.....	54
Abbildung 11:	Hydraulisches Schema der EE-Anlage, Fütterungsversuche 1-3. ....	56
Abbildung 12:	Hydraulisches Schema der RO-Anlage, Fütterungsversuche 1-3.....	58
Abbildung 13:	Hydraulisches Schema der SB-Anlage Fütterungsversuche 1 bis 3.....	60
Abbildung 14:	Konzentrationen der N-Produkte im Aquarienwasser, EE-Anlage, Pilotversuch .	70
Abbildung 15:	Konzentrationen der N-Produkte im Aquarienwasser, Bio-Anlage, Pilotversuch. .	71
Abbildung 16:	Konzentrationen der N-Produkte im Aquarienwasser, HF/UV-Anlage, Pilotversuch. ....	72
Abbildung 17:	Konzentrationen der N-Produkte im Aquarienwasser, O <sub>3</sub> -Anlage, Pilotversuch....	73
Abbildung 18:	Separate Darstellung der Ammoniumkonzentration im Aquarienwasser der O <sub>3</sub> -Anlage, Pilotversuch. ....	74
Abbildung 19:	N-Produkte im Aquarienwasser, Kontroll-Anlage, Pilotversuch .....	75
Abbildung 20:	Nitrit im Aquarienwasser Kontroll-Anlage, separate Darstellung, Pilotversuch . .	76
Abbildung 21:	Konzentrationsverlauf N-Produkte in EE-Anlagenwasser, Pilotversuch.....	77
Abbildung 22:	Konzentrationsverlauf N-Produkte in Bio-Anlagenwasser, Pilotversuch .....	77
Abbildung 23:	Konzentrationsverlauf N-Produkte in HF/UV-Anlagenwasser, Pilotversuch.....	78
Abbildung 24:	Konzentrationsverlauf N-Produkte in O <sub>3</sub> -Anlagenwasser, Pilotversuch.....	78
Abbildung 25:	Konzentrationsverlauf N-Produkte in Kontroll-Anlagenwasser, Pilotversuch .....	79
Abbildung 26:	Halblogarithmische Darstellung der Konzentration auf R2A und EMB kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (KBE/ml Wasser) sowie der Gesamtzellzahl/ml Wasser (ZZ) der EE-Anlage im Pilotversuch.....	80
Abbildung 27:	Halblogarithmische Darstellung der Konzentration auf R2A und EMB kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (KBE/ml Wasser) sowie der Gesamtzellzahl/ml Wasser (ZZ) der Bio-Anlage im Pilotversuch.....	81
Abbildung 28:	Halblogarithmische Darstellung der Konzentration auf R2A und EMB kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (KBE/ml Wasser) sowie der Gesamtzellzahl/ml Wasser (ZZ) der HF/UV-Anlage im Pilotversuch.....	82
Abbildung 29:	Halblogarithmische Darstellung der Konzentration auf R2A und EMB kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (KBE/ml Wasser) sowie der Gesamtzellzahl/ml Wasser (ZZ) der O <sub>3</sub> -Anlage im Pilotversuch.....	83

Abbildung 30:	Halblogarithmische Darstellung der Konzentration auf R2A und EMB kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (KBE/ml Wasser) sowie der Gesamtzellzahl/ml Wasser (ZZ) der Kontroll-Anlage im Pilotversuch .....	84
Abbildung 31:	Zeitverlauf der Beprobungen während des Fütterungsversuchs 1.....	89
Abbildung 32:	Verlauf des pH im Aquarienwasser der drei Anlagen, Fütterungsversuch 1 .....	90
Abbildung 33:	Verlauf Ammoniumkonzentration im Aquarienwasser der drei Anlagen, Fütterungsversuch 1. ....	91
Abbildung 34:	Verlauf Nitritkonzentration im Aquarienwasser der drei Anlagen, Fütterungsversuch 1. ....	92
Abbildung 35:	Verlauf Nitratkonzentration im Wasser der drei Anlagen, Fütterungsversuch 1; ..	93
Abbildung 36:	Konzentrationen im Aquarienwasser vorkommender Bakterien (Gesamtzellzahl) der drei Versuchsanlagensysteme Fütterungsversuch 1 .....	95
Abbildung 37:	Konzentration auf DEV kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (Koloniebildende Einheiten KBE/ml Wasser) der drei Versuchsanlagensysteme Fütterungsversuch 1. ....	97
Abbildung 38:	Konzentration auf R2A kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (Koloniebildende Einheiten KBE/ml Wasser) der drei Versuchsanlagensysteme Fütterungsversuch 1 .....	98
Abbildung 39:	Konzentration auf EMB-Agar kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (Koloniebildende Einheiten KBE/ml Wasser) der drei Versuchsanlagensysteme Fütterungsversuch 1. ....	99
Abbildung 40:	Abundanz der auf DEV, R2A und EMB kultivierten Bakterien aus den Aquarienwasser-proben der EE-, RO- und SB-Anlagen, Fütterungsversuch 1.....	100
Abbildung 41:	Auftreten abundanter, auf DEV kultivierter Bakterien aus Aquarienwasserproben zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten in den Anlagen Fütterungsversuch 1. ....	102
Abbildung 42:	Auftreten abundanter, auf R2A kultivierter Bakterien aus Aquarienwasserproben zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten in den Anlagen Fütterungsversuch 1. ....	103
Abbildung 43:	Auftreten abundanter, auf EMB kultivierter Bakterien aus Aquarienwasserproben zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten in den Anlagen Fütterungsversuch 1. ....	104
Abbildung 44:	Konzentration auf DEV-Agar kultivierter <i>Chryseobacterium</i> spp. und <i>Flavobacterium</i> spp. aus den Aquarienwasserproben der drei Versuchsanlagen Fütterungsversuch 1 .....	107
Abbildung 45:	Phylogenetische Zuordnung abundanter, auf R2A und Blutagar kultivierter egelassoziierter Bakterien Fütterungsversuch 1. ....	108
Abbildung 46:	Sterberaten (in %) der Blutegel in den Anlagen des Fütterungsversuchs 1, vor und nach der Blutfütterung.....	110
Abbildung 47:	Gewicht von 250 Blutegeln (errechnet aus Durchschnittsgewichten) zu Beginn und Ende des Versuchszeitraums Fütterungsversuch 1.....	111
Abbildung 48:	Zeitverlauf der Beprobungen während des Fütterungsversuchs 3.....	116
Abbildung 49:	Verlauf pH in den Aquarien, Fütterungsversuch 3.....	117
Abbildung 50:	Verlauf der Ammoniumkonzentration in Aquarien, Fütterungsversuch 3 .....	118
Abbildung 51:	Verlauf der Nitritkonzentration in Aquarien, Fütterungsversuch 3.....	119
Abbildung 52:	Verlauf der Nitratkonzentration in Aquarien, Fütterungsversuch 3 .....	119
Abbildung 53:	Chemischer Sauerstoffbedarf CSB der Anlagen, Fütterungsversuch 3.....	120
Abbildung 54:	Konzentrationsverlauf des gesamten organischen Kohlenstoffs TOC in den Anlagen, Fütterungsversuch 3 .....	121

Abbildung 55:	Konzentrationen im Aquarienwasser vorkommender Bakterien (Gesamtzellzahl) der Versuchsanlagen, Fütterungsversuch 3 .....	123
Abbildung 56:	Konzentration auf DEV-Agar kultivierbarer wasserassoziierter Bakterien in den Anlagen Fütterungsversuch 3 .....	125
Abbildung 57:	Relative Abundanz der abundantesten auf DEV-Agar kultivierten Bakterien aus den Aquarienwasserproben der Versuchsanlagen Fütterungsversuch 3.....	126
Abbildung 58:	Auftreten abundanter, auf DEV-Agar kultivierter Bakterien aus Aquarienwasserproben zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten in den Versuchsanlagen, Fütterungsversuch 3 .....	127
Abbildung 59:	Sterberaten (in %) der Bluteigel je Anlage vor und nach der Blutfütterung in Fütterungsversuch 3. ....	130
Abbildung 60:	Sterberaten (in %) der Bluteigel je Anlage vor und nach der Blutfütterung in Fütterungsversuch 3. ....	131
Abbildung 61:	Sterberaten (in %) der Bluteigel je Anlage vor und nach der Blutfütterung in Fütterungsversuch 3 .....	132
Abbildung 62:	Gewichte von 250 gesunden Bluteigeln zu Beginn und Ende des Fütterungsversuchs 3.....	133
Abbildung 63:	Verlauf und Anzahl der in Fütterungsversuch 3 verstorbenen Bluteigel nach Anlagen, kumuliert.....	135
Abbildung 64:	Auswertung Durchschnittsgewichte von 250 Bluteigeln am 17.10.2014 in den Anlagen, Fütterungsversuch 3.....	136
Abbildung 65:	Darstellung der Anzahl Bluteigel, die keine Nahrung aufgenommen haben, Fütterungsversuch 3. ....	137
Abbildungen im Anhang		
Abbildung A1:	Auswertung der Bluteigelzahlen in den Aquarien, EE-Anlage, Pilotversuch.....	150
Abbildung A2:	Auswertung der Bluteigelzahlen in den Aquarien, Bio-Anlage, Pilotversuch.....	150
Abbildung A3:	Auswertung der Bluteigelzahlen in den Aquarien, HF/UV-Anlage, Pilotversuch.....	151
Abbildung A4:	Auswertung der Bluteigelzahlen in den Aquarien, O <sub>3</sub> -Anlage, Pilotversuch.....	151
Abbildung A5:	Auswertung der Bluteigelzahlen in den Aquarien, Kontroll-Anlage, Pilotversuch.....	152
Abbildung A6:	Übersicht der identifizierten, auf DEV kultivierten Bakterien der Wasserproben, Fütterungsversuch 1.....	152
Abbildung A7:	Vergleich der abundantesten auf DEV-Agar kultivierten Bakterien der Wasserproben aus den drei Anlagen, Fütterungsversuch 3.....	153

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Sinneszellen und ihre Lage im Blutegel.....	6
Tabelle 2:	Grundschema der Blutegelvermehrung in der bbez im zeitlichen Verlauf .....	20
Tabelle 3:	Abiotische Stressfaktoren.....	33
Tabelle 4:	Volumina und Durchflussraten in den Anlagen, Pilotversuch .....	39
Tabelle 5:	Daten der Eichenextrakt-Dosierung in der EE-Anlage .....	41
Tabelle 6:	Verwendete Küvettentests Pilotversuch.....	48
Tabelle 7:	Verwendete Küvettentests Fütterungsversuche 1 bis 3 .....	62
Tabelle 8:	Auszählung der Blutegel am Ende des Pilotversuchs .....	86
Tabelle 9:	Konzentrationen im Aquarienwasser vorkommender Bakterien (Gesamtzellzahl) bei den drei Versuchsanlagen in Fütterungsversuch 1 .....	94
Tabelle 10:	Konzentration auf DEV, R2A und EMB kultivierter wasserassoziierter Bakterien in den Anlagen Fütterungsversuch 1 .....	96
Tabelle 11:	Konzentration auf DEV kultivierter <i>Chryseobacterium</i> spp. und <i>Flavobacterium</i> spp. aus den Wasserproben, Fütterungsversuch 1 .....	106
Tabelle 12:	Sterberaten (in %) und Anzahl der gestorbenen Blutegel in den Anlagen vor und nach der Blutfütterung in Fütterungsversuch 1 .....	109
Tabelle 13:	Gewicht von 250 Blutegeln zu Beginn und Ende des Fütterungsversuchs 1 .....	111
Tabelle 14:	Konzentrationen der Gesamtzellzahl wasserassoziierter Bakterien in den Versuchsanlagen, Fütterungsversuch 3 .....	122
Tabelle 15:	Konzentration auf DEV kultivierte wasserassoziierte Bakterien in den drei Versuchsanlagen, Fütterungsversuch 3 .....	124
Tabelle 16:	Sterberaten (%) und Anzahl der gestorbenen Blutegel in den Anlagen des Fütterungsversuchs 3 vor und nach der Fütterung .....	129
Tabelle 17:	Gewicht von 250 gesunden Blutegeln zu Beginn und Ende des Fütterungsversuchs 3.....	133
Tabelle 18:	Anzahl und Rate (%) der Blutegel, die bei der Fütterung in Fütterungsversuch 3 nicht gefressen haben .....	134
Tabelle 19:	Gewichtszunahme der Blutegel nach Anlagen, Fütterungsversuch 3 .....	136
Tabelle 20:	Minimalansprüche von Fischen an die Wasserqualität, ausgewählte Parameter ..	141
Tabellen im Anhang		
Tabelle A1:	Komponenten des Speichelsekrets der Blutegel.....	154
Tabelle A2:	Beispielhafte Auflistung möglicher Indikationen f. d. Blutegeltherapie.....	155
Tabelle A3:	Ausgesuchte Wasserparameter, gemessen in vier Teichen mit natürlichen Vorkommen von <i>H. verbana</i> in Rumänien .....	156
Tabelle A4:	Übersicht über Ammoniumoxidierer, Nitritoxidierer und Denitrifizierer aus den Filtern, Fütterungsversuch 3.....	157

## Abkürzungsverzeichnis

AMG	Arzneimittelgesetz (der BRD)
amoA	ammonia monooxygenase
ANOVA	Analysis of Variance; einfaktorielle Varianzanalyse
AOA	Ammonium-oxidierende Archaeen
AOB	Ammonium-oxidierende Bakterien
bbez	Biebertaler Blutegelzucht GmbH
BE	Blutegel
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRD	Bundesrepublik Deutschland
CF	Kanisterfilter
cm	Zentimeter
d.	der/die/das
daf	days after feeding, Anzahl Tage nach Fütterung
dbf	days before feeding, Anzahl Tage vor Fütterung
DEV	Deutsche Einheitsverfahren
DN	Nennweite (in mm)
Durchm.	Durchmesser
EE	Eichenextrakt
EMB-Agar	Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose Agar
EPS	Expandiertes Polystyrol
FDA	Food and Drug Administration (Arzneimittelzulassungsbehörde der USA)

ff.	folgende
g	Gramm
GDA	Glutardialdehyd
Gew.	Gewicht
Gfk	Glasfaserverstärkter Kunststoff
GMP	Good Manufacturing Practice (qualitätssichernder Leitfaden zur Herstellung von Arzneimitteln (u.a.))
h	Stunde
HDPE	High Density Polyethylen
HI	Hart-PVC
HT	Hochtemperatur (-Rohre, aus Polypropylen PP)
HWG	Heilmittelwerbegesetz
IAM	Institut für angewandte Mikrobiologie (Justus-Liebig-Universität Gießen)
ICH	International Conference on Harmonisation
i. F.	in Form (von)
KBE	Koloniebildende Einheiten
l	Liter
L/B/H	Länge/Breite/Höhe
LC 50/100	Letale Konzentration (bei der 50 bzw. 100% der Probanden sterben)
m	Meter
mm	Millimeter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
m <sup>3</sup>	Kubikmeter

min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
NOB	Nitrite-Oxidizing Bacteria
nt	Nukleotide; Angabe zur Länge der untersuchten DNA-Fragmente
nxrB	Nitrite oxidoreductase, Nitritoxidase
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PP	Polypropylen
PVC	Polyvinylchlorid
RAS	Recirculating aquaculture systems (Aquakultur in geschlossenen Kreisläufen)
resp.	respektive
QM	Qualitätsmanagement
rd.	rund
RO	Reverse Osmosis (Umkehrosmose)
RP	Regierungspräsidium (hier: RP Darmstadt)
s	Sekunde
SB	Schwimmsandfilter
SF	Sandfilter
SOP	Standard Operation Procedure (standardisierte Arbeitsanweisung)
Std	Stunde
Stk.	Stück
TOC	Total Organic Carbon, gesamter organischer Kohlenstoff

US	Ultraschall
UV	ultraviolett(es Licht)
ZZ	Zellzahl
$\mu\text{m}$	Mikrometer
”	Zoll, inch

# 1 **Einleitung und Zielsetzung**

## 1.1 **Generelle Problemstellung**

Therapeutisch genutzte Blutegel (*Hirudo medicinalis*, *Hirudo verbana* und *Hirudo orientalis*) sind in Deutschland rechtlich seit 2004 Fertigarzneimittel. Es besteht daher die Notwendigkeit, die Tiere mit hohem Qualitäts- und Sicherheitsstandard wirtschaftlich bereitzustellen. Bisher wird der Bedarf (BRD: etwa 500.000 Tiere jährlich) überwiegend aus Wildfängen bedient. Die deutsche Zulassungsbehörde (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM) strebt an, den Bedarf in absehbarer Zeit aus kontrollierten Zuchtbetrieben zu decken, um die Arzneimittelsicherheit zu verbessern. Daher müssen Blutegel künftig verstärkt unter kontrollierten Bedingungen vermehrt werden. Hierzu sind Systeme aufzubauen, die es ermöglichen, Blutegel so zu halten, dass sie gesund sind, sich paaren und vermehren. Die Jungegel müssen in Intensivhaltung mit möglichst geringen Verlusten aufgezogen und zur Verkaufsreife gebracht werden.

Die Biebertaler Blutegelzucht GmbH bbez in Biebertal bei Gießen, Hessen, ist Westeuropas größter Blutegelherstellbetrieb und stellt jährlich ca. 350.000 Blutegel für den therapeutischen Bedarf zur Verfügung (Bezugsjahr 2016). Die vorliegende Arbeit baut auf den Erfahrungen auf, die bisher mit der Blutegelhaltung gemacht wurden, sowohl in Biebertal, als auch in anderen Betrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen unmittelbar in die Produktionsprozesse der bbez einfließen, um so Qualität und Wirtschaftlichkeit zu verbessern.

Auf den ersten Blick scheinen Techniken, die in der Aquakultur etabliert sind, eine Ausgangsbasis für Adaptionen zu sein. Die Unterschiede zu Aquakultursystemen, etwa für die Zier- und Speisefischzucht, sind aber erheblich:

- Blutegel werden in Gruppen von bis zu 10.000 Tieren mit Blut gefüttert; Blut ist ein guter Nährboden für diverse Mikroorganismen.
- Insbesondere nach Fütterungen erbrechen Blutegel einen Teil ihrer Blutmahlzeit in das Haltungswasser.
- Blutegel werden selten gefüttert, zwischen den Fütterungen liegen bis zu 6 Monate.
- Wasserreinigungssysteme werden dadurch diskontinuierlich belastet.
- Die Konzentration, insbesondere von Stickstoffprodukten im Haltungswasser, schwankt dadurch sehr stark und teilweise abrupt.
- Da die Tiere als Fertigarzneimittel zur Verfügung gestellt werden und um Resistenzbildung bei egel- und/oder wasserassoziierten Bakterien zu vermeiden, kommt ein Einsatz von Antibiotika bei der Produktion nicht in Frage.

Aus den genannten Gründen kann nur sehr eingeschränkt auf Erfahrungen aus etablierten aquatischen Produktions- und Haltungssystemen zurückgegriffen werden. Für eine Blutegelvermehrung müssen eigene Wege erforscht und eingesetzt werden, das zeigen bisherige Erfahrungen in der BBEZ. Ursächlich für die Erkrankungen und Verluste sind eventuell der hohe Infektionsdruck durch die intensiven Haltungsbedingungen und die damit einhergehenden Qualitätseinbußen des Haltungswassers. Da Blutegel mit frischem Blut gefüttert werden, belasten sowohl das Fütterungsmedium Blut selbst und seine Abbauprodukte, als auch die Ausscheidungsprodukte der Tiere das Wasser in erheblichem Maße. Dies kann zu einer erhöhten Anfälligkeit der Tiere gegenüber Krankheiten und ggf. zum Tod führen. Eine Besonderheit stellt insbesondere die Situation nach der Fütterung dar. Da die Tiere erst nach einer mehrmonatigen Hungerphase mit entsprechend reduzierten Ausscheidungen gefüttert werden, steigt die Belastung des Wassers direkt nach der Fütterung schnell und stark an. Bis biologische Filtersysteme in der Lage sind, etwa Ammonium zu Nitrit zu oxidieren, muss in ihnen eine adäquate Population von Mikroorganismen existieren. Diese aufzubauen benötigt Zeit. Geschieht die Wasserreinigung nicht schnell genug, erkranken die Tiere und erholen sich selten vollständig. Erkrankungen führen zum Tod oder machen die Blutegel unverkäuflich. Da die Vermutung nahelag, dass die mit der Fütterung zusammenhängende Veränderung der Wasserqualität mit dem Erkranken und Versterben der Blutegel korreliert, wurde insbesondere die chemische Wasserqualität genauer betrachtet. Hierfür wurden hauptsächlich die Stickstoffprodukte Ammonium, Nitrit und Nitrat ausgewählt, da sie auch in anderen Aquakulturen als Leitgrößen gelten. Zusätzlich wurden die im Haltungswasser vor und nach der Fütterung detektierten Bakterien betrachtet. Darüber hinaus wurden auch andere potentielle Störfaktoren identifiziert und bewertet. Diese Analyse findet sich im Ergebnisteil.

Laut immer wieder geäußerten Behauptungen von Blutegelhändlern und -haltern bevorzugen Blutegel einen pH im leicht sauren Bereich. Dies wurde in Gewässern mit natürlichem Blutegelvorkommen überprüft (Tabelle A3).

### 1.1.1 Die Blutegel

#### 1.1.1.1 Systematische Einordnung der Blutegel

Weltweit gibt es etwa 650 Egelarten (Storch, Welsch, 2005; Sawyer, 1986). Wie erwähnt werden nur wenige davon in der Medizin eingesetzt, hierzu zählt in Europa heute insbesondere der Medizinische Blutegel *H. verbana*, auf den hier besonders eingegangen wird. Egel oder Hirudineen gehören systematisch in die Stammgruppe der *Articulata* oder „Gegliederten“ und dort in den Stamm der *Annelida*, der Glieder- oder Ringelwürmer. Eingeteilt werden die Anneliden in 3 Klassen:

- *Polychaeta* oder Vielborstige
- *Myzostomida* oder Saugmäuler
- ***Clitellata*** oder Gürtelwürmer, gegliedert in zwei Ordnungen:
  - *Oligochaeta* oder Wenigborster
  - ***Hirudinea*** oder Egel, mit zwei Unterordnungen:
    - Borstenegel *Acanthobdellae*
    - **Borstenlose Egel *Rhynchobdellae***, mit den Überfamilien:
      - Rüsseegel *Rhynchobdellae*
      - Schlundegel *Pharyngobdellae*
      - **Kieferegel *Gnathobdellae***, mit drei Familien:
        - Landegel *Haemadipsidae*
        - *Semiscoleidae*
        - **Blutegelartige *Hirudinidae***, mit 50 Arten; hierzu gehören fast alle medizinisch genutzte Blutegel.

Quellen: (Herter, 1968, Sawyer, 1986)

Die Medizinischen Blutegel *H. medicinalis*, *H. verbana* und *H. orientalis* sind auf Blut und tierische Gewebeflüssigkeit spezialisiert, somit Carnivoren (Herter, 1968; Sawyer, 1986). Dass nur wenige Arten in der Medizin eingesetzt werden liegt vermutlich daran, dass nur diese wenigen Arten eine Speichelzusammensetzung haben, die eine lindernde oder heilende Wirkung im Organismus des Wirtes haben. Von *H. medicinalis* sind kaum noch größere Vorkommen bekannt. *H. orientalis* hat sein Verbreitungsgebiet in der Kaukasusregion, es liegen keine Berichte darüber vor, dass diese Art in Mitteleuropa systematisch therapeutisch eingesetzt wurde. *H. verbana* ist im Donaeinzugsgebiet und rund um das Schwarze Meer verbreitet. Von dieser Art sind in den natürlichen Habitaten (in der Türkei, im Donaeinzugsgebiet, etc.) wesentlich größere Populationen bekannt, weshalb die Entnahme aus der Natur bei *H. verbana* weniger problematisch erscheint.

### 1.1.1.2 Anatomie der Blutegel

Blutegel haben als wechselwarme Invertebraten kein knöchernes Skelett. Sie besitzen als *Euhirudinea* 34 Segmente, die in Längsrichtung aufgereiht sind (Metamerie). Am Vorderende liegt als erster der aus 6 Segmenten gebildete Kopflappen oder auch Vorderkörper (Prostomium) mit Gehirn (Cerebralganglion) und Mund. In der Mundscheibe befinden sich die Mundöffnung mit drei zahnbesetzten Kiefern sowie der Pharynx. Anschließend formen 21 Segmente den Mittelkörper (Sawyer 1986). Im vorderen Bereich des Mittelkörpers (Segmente 11 und 12) liegt der Clitellarbereich mit den Geschlechtsorganen (Sawyer 1986). Kaudal formen sieben Segmente den hinteren Saugnapf. Die Segmente des Mittelkörpers haben Großteils eine übereinstimmende Organisation mit Ganglien, Metanephridien und Coelomsäcken, hingegen sind die Geschlechtsorgane (Gonaden) bei den Blutegeln auf die Segmente 11 und 12 beschränkt. Die äußerliche Ringelung ist mit der Segmentierung nicht identisch, es kommen bis zu fünf äußere Ringe auf ein Segment. Durchzogen wird der gesamte Körper von vier starken Längsmuskeln, die in eine Diagonal- und eine Ringmuskulatur eingebettet sind. Zusammen mit der flüssigkeitsgefüllten Leibeshöhle (Coelomreste) fungiert die Muskulatur als ein Hydroskelett (Sawyer 1986; Storch & Welsch 2005; Westheide 1996; Storch & Welsch 1997; Storch & Welsch 2006), (Abbildung 1). Durch diese Konstruktion können sich die Blutegel mittels peristaltischer Bewegungen des gesamten Körpers sehr flexibel bewegen und selbst in relativ festem Boden lange Gänge bohren, in denen sie sich verstecken oder ihre Kokons ablegen. Sehr gut lässt sich diese Peristaltik beim Saugvorgang beobachten, der muskulöse Pharynx saugt aktiv Blut aus der vom Blutegel geöffneten Wunde und pumpt es in Magen und Darm. Beide besitzen mehrere Blindsäcke zur Speicherung der aufgenommenen Nahrung. So kann ein Blutegel ein Mehrfaches seines Körpergewichtes (Michalsen & Roth 2012) an Nahrung aufnehmen und flüssig speichern. Während der Nahrungsaufnahme beginnt der Blutegel, das aufgenommene Blut einzudicken, er scheidet über die Haut Wasser, in Schleim gebunden, aus. Der Mittelkörper wird zum größten Teil von Magen und Darm genutzt. Magen und Darm der Blutegel werden hauptsächlich von den symbiotischen Bakterien der Gattung *Aeromonas* und *Mucinivorans hirudinis* (früher als *Rikenella*-artig, ein nicht kultivierbares Bakterium, bezeichnet) besiedelt, die das aufgenommene Blut aufschließen und dem Blutegel in verdaulicher Form zur Verfügung stellen. Vermutet wird, dass *Aeromonas* Poren in die Oberfläche der Erythrozyten verursacht und dort Zucker abbaut, während *M. hirudinis* Schleim, der die Magen- und Darmwand der Blutegel belegt und welche nach einer Mahlzeit verdickt wird, fermentiert (Marden et al. 2016; Nelson & Graf 2012; Graf et al. 2013; Nelson et al. 2015). Obwohl im Magen der

Blutegel Bakterien vorhanden sind, die in der Lage sind, Blut zu lysieren, bleiben aufgenommene Erythrozyten Monate lang intakt (Sawyer et al. 2011; Maltz & Graf, 2011). Speichelinhaltsstoffe, die beim Biss sowohl in die Wunde als auch in den in den Blutegel einfließenden Blutstrom eingeleitet und damit aufgenommen werden, verhindern die Gerinnung. Das im Blut von Säugetieren vorhandene Komplementsystem bleibt aber intakt, wodurch eventuell im Blut enthaltene andere Mikroorganismen in ihrer Entwicklung gehemmt werden. Die Symbionten der Gattung *Aeromonas* sowie die Rikenella-artigen *M. hirudinis* werden vom Komplementsystem offenbar nicht angegriffen (Graf J. 1999). Dieses komplexe System ermöglicht dem Blutegel, mehrere Monate von einer Mahlzeit zu zehren und zu überleben, ohne die eigene Körpersubstanz angreifen zu müssen (Michalsen & Roth 2012). Blutegel können bis etwa 24 Monate mit einer Mahlzeit auskommen, bei dieser Dauer wird dann allerdings Körpersubstanz abgebaut, der Blutegel „schrumpft“ wieder (Michalsen & Roth 2012). Fressen können Blutegel nur, wenn sie ausreichend Speichel synthetisiert haben, um das aufzunehmende Blut bis zur vollständigen Verdauung flüssig zu halten und Bakterien, die keine Verdauungssymbionten sind, an der Hämolyse zu hindern. Diese Synthese kann mehrere Monate dauern. Das wird daraus geschlossen, dass Blutegel nach einem erfolglosen Biss bis zu mehrere Monate nicht wieder beißen, obwohl sie hungrig sind. Umgekehrt wachsen Blutegel nur dann, wenn sie Nahrung zu sich nehmen konnten. Mit umgekehrter Fließrichtung wird eventuell zu viel aufgenommene oder unerwünschte Nahrung wieder erbrochen. Wird Blut nicht aus einem lebenden Organismus gesaugt, kann u. U. auch Luft mit eingesaugt werden. Dies führt vermutlich ebenfalls zum Erbrechen.

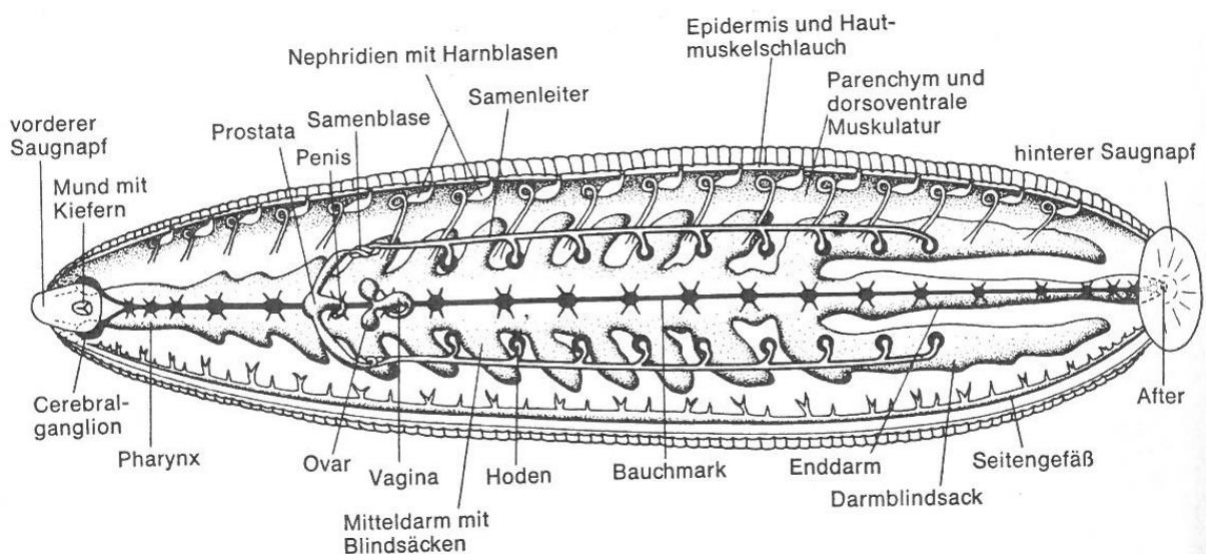


Abbildung 1: Organisationsschema des Blutegels (Ansiicht von ventral);  
nach Storer, Usinger (Storch & Welsch 1997)

Blutegel besitzen ein Nervensystem, das dem Strickleiternervensystem der Regenwürmer ähnlich ist (Michalsen & Roth 2012). Grundsätzlich haben Blutegel zwei Typen von Sinneszellen (Tabelle 1):

- Typ a: In die äußere Haut (Tegument) eingebettete Sinnesorgane für Reize, die aus gewisser Entfernung auf den Blutegel einwirken und
- Typ b: Rezeptoren für mechanische Reize, die unter der Haut im Zentralnervensystem liegen.
- 

Tabelle 1: Sinneszellen und ihre Lage im Blutegel (Sawyer 1986; Herter 1968).

Rezeptor für	Lage	Typ, Anzahl
Licht	Tegument, dorsal-rostral	a, 10
chemische Reize	Tegument, jedes Segment	a
Wasserbewegung	Tegument, jedes Segment	a
Berührung, Druck	Zentralnervensystem	b
„Schmerz“	Zentralnervensystem	b
Temperatur	Vermutlich: Kopfbereich	?

Auch mittels des Temperatursinns gelingt es den Blutegeln, potentielle Wirtstiere zu orten. Nach dem ersten Anheften wird mit der vorderen Lippe tastend nach einer geeigneten Stelle gesucht. Hierbei spielt die lokale Oberflächentemperatur vermutlich ebenfalls eine Rolle. Blutegel sind eurytherm nicht sehr begrenzt, kommen also mit einer großen thermischen Bandbreite zurecht. Bei *H. medicinalis* liegt dieser Bereich etwa zwischen  $-5^{\circ}\text{C}$  bis ca.  $+44^{\circ}\text{C}$  (Herter 1968). Sie zeigen eine sogenannte Schreckreaktion bei Temperaturen ab ca.  $39^{\circ}\text{C}$  und verfallen in eine Wärmestarre bei einer Temperatur von ca.  $43,5^{\circ}\text{C}$  (Herter 1968). Die Angabe der unteren Temperaturschwelle ( $-5^{\circ}\text{C}$ ) beruht auf eigenen Beobachtungen, dass *H. verbana* im Wasser oder auch Erdreich unter der Frostgrenze überleben kann. Wo die noch tolerierte Grenze liegt wurde bisher nicht ermittelt, ebenso wenig die Überlebensdauer unter diesen Bedingungen. Kranial dorsal gelegene Photorezeptoren ermöglichen dem Blutegel, Bewegung zu orten.

### 1.1.1.3 Verhalten der Bluteigel, Nahrungsaufnahme und Fütterung

Bluteigel sind als aquatile Tiere überwiegend im Wasser zu finden. Da sie jedoch über die gesamte Körperoberfläche atmen (diffuse Hautatmung), können sie sich auch außerhalb des Wassers dauerhaft aufhalten. Sie sind gute Schwimmer und können sich auf fast jedem festen Untergrund sicher bewegen. Beim Aufenthalt außerhalb des Wassers dürfen sie nicht dehydrieren. Die Umgebungsbedingungen bestimmen daher, ob und wie lange ein Bluteigel außerhalb des Wassers bleiben kann. Ist die Umgebungsfeuchtigkeit hoch genug, hält er es unbegrenzt aus. Offenbar kann er sogar in sehr sauerstoffarmer Umgebung einige Zeit überleben (Herter 1968). Im Wasser zeigen sie gelegentlich Atembewegungen. Hierbei ist der hintere Saugnapf angeheftet, der Körper oszilliert in sinusartigen Schwingungen kontinuierlich von dorsal nach ventral. Das bewirkt eine Art künstlicher Strömung und somit einen ständigen Wasserwechsel rund um den Bluteigelkörper (Herter 1968). Als Habitat bevorzugen sie stehende oder langsam fließende Gewässer. Flache Gewässer(-bereiche) werden bevorzugt, vermutlich da sich passende Wirte in tieferen Gewässern nicht finden. In fließenden Gewässern werden nur die ruhigeren und flachen Randbereiche besiedelt, zumal die Bluteigel mit etwa 15 cm/s nicht besonders schnell schwimmen können. Sie haben eine relative Dichte  $>1$ , müssen daher aktiv schwimmen.

Der Bluteigel ist als Annelide (Ringelwurm) ein protandrischer Zwitter. Seine männlichen Geschlechtsorgane werden zuerst reif, später entwickeln sich auch die weiblichen. Er pflanzt sich ausschließlich geschlechtlich fort. Üblich ist vermutlich die gleichzeitige gegenseitige Befruchtung (Sawyer 1986). Die Paarung der adulten Tiere geschieht nach bisheriger Kenntnis erst dann, wenn mehrere Voraussetzungen erfüllt sind:

- Letzte Mahlzeit darf nicht lange zurück liegen (Jagd- und Paarungsmodus sind nach bisheriger Beobachtung immer zeitlich getrennt).
- Paarung wurde bisher nur im (flachen) Wasser beobachtet.
- Wassertemperatur darf nicht zu niedrig sein (beobachtet wurden in der bbez Paarungen ab ca. 12°C).
- Passende Jahreszeit (beobachtet wurden in der bbez Paarungen zwischen April und Oktober); es liegt ein circannualer Rhythmus vor.

Bei der Paarung liegen die Tiere in Gegenrichtung ventral partiell aneinander, so dass die beiden Penisse in die Clitelli der Partner eingeführt werden können. Die Paarung kann mehrere Stunden dauern. Bei stark unterschiedlichen Größen der Partner ist die einseitige Befruchtung zu vermuten. Ob die Paarung wirklich gegenseitig gleichzeitig stattfindet, ist nicht belegt, es wird daraus geschlossen, dass sich nur etwa gleich große Tiere miteinander verpaaren, wenn genügend Auswahl an Partnern vorhanden ist. Da sie protandrisch sind wird aber vermutlich auch die einseitige Befruchtung vollzogen (Sawyer 1986). In der Natur kann der Grundzyklus der Bluteigel in drei Phasen eingeteilt werden:

- a. Suchen und Beobachten: Hierbei schwimmen die Tiere mit langsamen Bewegungen durch das Wasser oder ruhen, etwa an Pflanzen, Steinen, oder auf dem Grund; sie warten auf potentielle Wirte.
- b. Jagen: Nach der Ortung eines potentiellen Wirtes schwimmen die Tiere mit schnellen Bewegungen zum Wirt und versuchen, sich anzuheften; dann wird eine geeignete Stelle für den Biss gesucht, der kraniale Saugnapf angeheftet, gebissen und Blut gesaugt.
- c. Verdauen: Nach erfolgreicher Nahrungsaufnahme ziehen sich die Tiere möglichst in einen Schutz zurück; diesen Schutz stellt beispielsweise ein selbst hergestellter Gang im Boden- oder Ufersubstrat dar.

Phase c geht dann wieder in Phase a über, nachdem der Blutegel den geschützten Ort verlassen hat (Michalsen & Roth 2012). Die Paarung und Fortpflanzung schließt sich an Phase b an, falls die Rahmenbedingungen (Temperatur, Jahreszeit, geeignete Lokalität, etc., s. o.) stimmen. Der Rückzug in den Schutz etwa eines engen Ganges im Substrat, oder auch zwischen Steine gepresst, resultiert vermutlich aus dem kannibalischen Verhalten der Blutegel. Hungrige Tiere können bei Gelegenheit satte Tiere anbeißen und sich einen Anteil an der Nahrung holen (Kutschera & Roth 2005). Durch den Rückzug in Strukturen mit Rundum-Körperkontakt (Thigmotaxis) können sie sich weitgehend vor Kannibalismus und Fressfeinden schützen. Mehrmals in der Woche streifen Blutegel ihre äußere Epidermis ab. Sie sind überwiegend tagaktiv.

Unter natürlichen Bedingungen sind Blutegel Ektoparasiten, die versuchen, möglichst unauffällig an ihrem Wirt zu saugen. Nachdem sie einen potentiellen Wirt geortet haben, schwimmen oder kriechen sie an ihn heran und halten sich mit ihren Saugnapfen fest. Dann suchen sie in einem eher kleinen Umkreis mittels ihrer Sensoren am Kopf eine geeignete Stelle zum Beißen, hierzu wird der kraniale Saugnapf gelöst und das Tier vollführt Suchbewegungen. Ist eine geeignete Stelle detektiert, wird mittels des Saugnapfes die Haut an der gewählten Stelle straff gehalten und mit schwingenden Bewegungen der drei zahnbesetzten Kiefer durch die Haut in das Gewebe gesägt, bis Blut anfängt zu fließen. Da üblicherweise kapillare Blutgefäße erreicht werden, pumpen Blutegel durch peristaltische Kontraktion aktiv Blut aus dem Körper des Wirtes in ihren Magen-Darmtrakt.

Gerade Jungtiere erhöhen ihr Gewicht während einer Fütterung um 500 % und mehr. Man sieht darin eine mögliche Ursache für Überfressen, Erbrechen und eventuell sogar Erkranken und Sterben der Tiere in den ersten Wochen nach der Fütterung. Nach der Fütterung sollte den Tieren die Möglichkeit geboten werden, sich zu verstecken. Das entspricht ihrem natürlichen Verhalten, das in der Gläserhaltung nicht umgesetzt werden kann. Störungen gilt es in dieser Zeit auf ein notwendiges Minimum zu beschränken. Dem steht in der Gläserhaltung die Notwendigkeit für die nahezu tägliche Reinigung und die damit einher gehende Störung entgegen.

Durch die in dieser Periode vorhandene Neigung zum Erbrechen muss auf die Wasserqualität geachtet werden. Beobachtungen in der bbez deuten darauf hin, dass eine schlechte Wasserqualität eine stärkere Neigung zum Erbrechen auslöst, die negative Wirkung verstärkt sich selber. Um die Wasserwerte in einem akzeptablen Rahmen zu halten, muss das Wasser entweder ständig erneuert, oder mit geeigneten, leistungsfähigen Systemen aufbereitet werden. So lassen sich starke Schwankungen in der Wasserqualität und Störungen der Bluteigel minimieren. Die mit dem Umlauf bzw. Austausch verbundene Strömung sollte so gering wie möglich sein.

### **Rahmenbedingungen der Nutzung von Bluteigeln**

Schon vor über 4.000 Jahren beobachteten Menschen, dass Bluteigel bei bestimmten Beschwerden oder Leiden helfen können, wenn sie Morbide beißen (Michalsen & Roth 2012). Evident war, dass durch den Bluteigelbiss und die anschließende Nachblutung ein Blutverlust stattfand. Daher sah man eine Verbindung zwischen Blutverlust und lindernder oder heilsamer Wirkung. Menschen setzten bestimmte Bluteigelarten zur Linderung von diversen Beschwerden gezielt ein. Da nicht alle Blut saugenden Bluteigel die gewünschte lindernde Wirkung bei Warmblütern haben, es aber nicht nur eine Art mit dieser Wirkung gibt, fasst man die medizinisch wirksamen Arten unter dem Begriff „Medizinische Bluteigel“ zusammen. Je nach Region und jeweiligem Vorkommen werden weltweit mindestens 17 Arten eingesetzt (Herter 1968). Aufgrund der mittels Bluteigeltherapie erzielbaren Heilerfolge und des geringen damit verbundenen Risikos, war die Therapie weit verbreitet. Die Bluteigel wurden dazu auch in großer Zahl ausgeführt, etwa in Gebiete der heutigen USA (Herter 1968). Eingesetzt wurden sie in Europa hauptsächlich von Heilern, Badern und Ärzten, auch die Selbstmedikation war üblich (Michalsen & Roth 2012). Dies, zusammen mit Veränderungen im natürlichen Habitat der Bluteigel (Wasserqualität, Zugang zu Wirten, etc.), führte zu einer Übernutzung der natürlichen Vorkommen und sukzessive zum Verschwinden der Art aus ihren natürlichen Habitaten in Mitteleuropa. Die Populationen konnten sich bis heute kaum erholen. Aus diesem Grund kamen erst *H. medicinalis*, später auch *H. verbana* und *H. orientalis* auf die Rote Liste der bedrohten Invertebraten, auf die Liste der geschützten Tierarten (Anhang II, schutzbedürftige Arten) und unter den Schutz des Washingtoner Artenschutzabkommens (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES). Sie dürfen daher international nur unter Auflagen der Natur entnommen und gehandelt werden (Naturschutz, Rote Liste gefährdeter Tiere 1983; Naturschutz 2015; Flora 2015). Die Entnahme von Tieren aus natürlichen Habitaten, etwa im Donaueinzugsgebiet oder in der Schwarzmeerregion, wird heute von den zuständigen Naturschutzbehörden zeitlich (Schonzeit) und in der Menge reglementiert und überwacht. Die Ausfuhr ist nur in Verbindung mit Fangvorschriften und Genehmigungspapieren legal.

Nur wenige Therapeuten in Mitteleuropa nutzten die Blutegel in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts, wodurch die Tiere kaum mehr nachgefragt wurden und gleichzeitig das Wissen um die Therapie nur noch bei wenigen Spezialisten vorhanden war. Innerhalb einiger Jahrzehnte war aus einer weit verbreiteten Therapieform ein kritisch beäugter therapeutischer Ansatz für scheinbar rückwärtsgewandte Esoteriker geworden. Seit den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts findet eine Renaissance der Blutegeltherapie statt, begleitet durch wissenschaftliche Belege für ihre Wirksamkeit und physiologische Wirkkinetik (Michalsen & Roth 2012). Das wiederum führt zu einer stetig steigenden Nachfrage nach medizinischen Blutegeln und zu einer Prüfung der rechtlichen Stellung der Tiere durch die Behörden und letztlich in Deutschland zu ihrer Einordnung als humantherapeutisches Fertigarzneimittel. Daraus resultierte die Notwendigkeit einer arzneimittelrechtlichen Zulassung. Im Zusammenhang mit der Zulassungspflicht und aus den begleitenden Gesprächen, die die bbez mit der Behörde geführt hat, wurde deutlich, dass die für die Zulassung zuständige Behörde, das BfArM, mittelfristig einen Umstieg auf selber vermehrte (Zucht-) Blutegel wünscht. Laut Definition des BfArM sind Zuchtegel „... Blutegel, die nach dem Schlüpfen aus den Eiern in den Kokons unter kontrollierten Bedingungen gezüchtet und gehalten worden sind.“ Importegel sind laut oben zitierter BfArM-Definition „Entsprechend der gegenwärtigen Praxis ... Blutegel, die in ihren natürlichen Lebensräumen wild aufgewachsen sind.“ (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte 2009). Die bis dato überwiegend als Handelsbetriebe tätigen Blutegelvertreiber müssen sich daher um den Aufbau einer artgerechten und ökonomisch tragfähigen Vermehrung der medizinischen Blutegel bemühen, um weiter am Markt bestehen und die genannten Erwartungen erfüllen zu können. Bei der Herstellung des Fertigarzneimittels Blutegel wird aus einem lebenden Tier, das unter Artenschutz steht, durch einen definierten und zugelassenen Prozess ein Arzneimittel. Bisher werden in Deutschland lediglich die *Hirudo*-Arten *H. medicinalis* und *H. verbana*, (Herter 1968) therapeutisch eingesetzt und auf diese bezieht sich der arzneimittelrechtliche Zulassungsantrag der bbez. Da sich *H. verbana* leichter vermehren lässt, wird überwiegend diese Art vermehrt und verkauft (Trontelj & Utevsky 2005; Neseemann & Neubert 1999). Daher beschränkt sich auch die vorliegende Arbeit auf diese Art und ihre Herstellung. Von der therapeutischen Wirksamkeit sind keine Unterschiede bekannt. Wenn im Folgenden von Blutegeln, Kulturegeln, Wildegeln, oder Zuchtegeln die Rede ist, ist *H. verbana* gemeint. Auch wurden alle Versuche für diese Arbeit mit dieser Art durchgeführt.

### 1.1.2 **Rechtliche Rahmenbedingungen für das Arzneimittel Blutegel**

Aufgrund der besonderen Stellung des Blutegels im Arzneimittelrecht (lebendes Arzneimittel), sind auch die Kriterien für die rechtliche Einordnung teilweise abweichend zu anderen Arzneimitteln geregelt. Hersteller des Fertigarzneimittels Blutegel sind Betriebe, die

- eine arzneimittelrechtliche Herstellerlaubnis besitzen -und-
- aus der Natur entnommene Blutegel durch einen zugelassenen Prozess zum Arzneimittel machen (Handelsbetrieb) -oder-
- Blutegel für den medizinischen Bedarf nach einem zugelassenen Verfahren vermehren (Zuchtbetrieb)

Eine Kombination aus Handels- und Zuchtbetrieb ist möglich. Arzneimittelrechtlich gelten beide Betriebsformen als Arzneimittelherstellbetriebe. In den Verkehr gebracht, also verkauft werden, darf das Arzneimittel nur, wenn es eine arzneimittelrechtliche Zulassung besitzt oder das Zulassungsverfahren unter bestimmten Voraussetzungen läuft (Bundestag 2005). Die Anforderungen an das Medikament Blutegel können zwar weitgehend analog zu den pharmazeutisch-chemischen Produkten definiert werden. Kurz zusammen gefasst geht es um Unbedenklichkeit, Qualität und Wirksamkeit. Die Anforderungserfüllung muss aber zwangsläufig einen anderen Weg gehen als bei pharmazeutisch-chemischen Produkten, da es sich um ein lebendes Arzneimittel handelt.

Nach heutiger Erkenntnis lebt kein komplexer tierischer Organismus dauerhaft ohne artgerechte Begleitflora. Blutegel können, wie andere Lebewesen auch, nicht ohne eine artgerechte mikrobielle Besiedlung leben oder in keimfreier Umgebung gehalten oder vermehrt werden. So benötigen sie beispielsweise zwingend bestimmte Darmsymbionten (z.B. *Aeromonas* spp., *Rikenella*-ähnliche *Mucinivorans hirudinis*) (Michalsen & Roth 2012; Nelson & Graf 2012). Im Epithel der Nephridien der Blutegel wurden *Ochrobactum* spp. nachgewiesen, die sich ebenfalls auf der Haut und im Habitatwasser finden lassen (Kikuchi et al. 2009). Da die Nephridien Ausscheidungsorgane sind, ist zu vermuten, dass diese auch *Ochrobactum* spp ausscheiden. Eine Vielzahl weiterer Mikroorganismen lebt in und auf dem Blutegel und ist daher auch in dem Habitatwasser regelmäßig zu finden. In der vorliegenden Arbeit richtet sich das Augenmerk auf die Haltung der Blutegel in einer Umgebung, die für die Tiere zuträglich ist. Die Arzneimittelsicherheit steht hierbei nicht im Vordergrund, muss aber unbedingt beachtet werden. Da es sich um ein lebendes Tier handelt, müssen die üblichen messbaren Parameter um die Beobachtung und Beschreibung ergänzt werden.

### 1.1.3 Wirkweise der Blutegelsaliva in der Therapie

Die therapeutische Wirkung von Blutegeln auf den Organismus der Warmblüter beruht auf zwei Faktoren, dem lokalen Blutentzug sowie dem Einleiten der Saliva (Speichel) in die Bisswunde. Um diese Wirkung zu erzielen ist es notwendig, dass der Blutegel an geeigneter Stelle, die von der gewünschten Wirkung abhängt, den Patienten beißt, dabei seine Saliva in die Wunde einleitet und Blut saugt. Früher nahm man an, dass hauptsächlich der Entzug einer, in Anbetracht der Größe des Blutegels, erheblichen Menge Blutes einen heilenden Einfluss auf den Patienten hat. Seit die Saliva eingehender untersucht wird weiß man, dass diese ein Gemisch aus mindestens 200 Substanzen ist. Über die einzelnen Komponenten ist bisher noch nicht allzu viel bekannt, wenn man von bisher zehn genauer beschriebenen Einzelsubstanzen absieht (Michalsen & Roth 2012), Hirudin ist hiervon die bekannteste. Das Gesamtgemisch hat offenbar eine weiter reichende Wirkung als die Einzelkomponenten, so dass bis heute der Biss des Blutegels bei vielen Indikationen ohne Alternative erscheint. Dies berichten nahezu alle blutegelerfahrenen Therapeuten. Gerinnungshemmung, Gefäßkrampflösung, Thrombolyse, Beschleunigung des Lymphflusses, Immunisierung: All diese Wirkungen lassen sich für die Saliva nachweisen und wirken physiologisch verzahnt. Im Bereich des Pharynx des Blutegels liegen die Drüsenzellen, die die Komponenten der Saliva synthetisieren und sekretieren. Durch feine Kanäle gelangen die Sekrete zu Öffnungen zwischen den Kalkzähnen in den drei Kiefern, so dass sie beim Biss fein verteilt in die Wunde abgegeben werden können. Nach heutigem Wissen sind die Drüsenzellen und die Saliva keimfrei (Michalsen & Roth 2012). Die bisher bekannten Komponenten und ihre physiologische Wirkung sind im Anhang zusammen gefasst (Tabelle A1).

Obwohl die pharmakologische Wirkung der Saliva überwiegend lokal begrenzt ist, lassen sich doch systemische Wirkungen auf den Organismus beobachten. Dies betrifft etwa eine Verringerung der Blutviskoelelastizität und der Blutaggregationsneigung, aber auch andere Wirkungen (Chmiel et. al. 1989). Das wiederum entspricht der biologischen Grundregel, dass in einem lebenden Organismus lokale Vorgänge immer einen Einfluss auf den gesamten Organismus haben (Purves et. al. 2006). Die erwähnte Keimfreiheit der Salivadrüsenzellen und der Saliva ist offensichtlich mit verantwortlich dafür, dass die Blutegeltherapie mit so geringen Risiken (unerwünschte Nebenwirkungen, Infektionsgefahr, etc.) behaftet ist. Der Blutegel kombiniert mit seinem Biss die pharmakologische Wirkung mit den Effekten der Hämodilution (Aderlass). Daher wird die Blutegeltherapie auch bei den ausleitenden Verfahren (Humoraltherapie) eingeordnet.

Die antike Vorstellung über die Wirkweise von Blutentzug (Humoraltheorie) bei bestimmten Beschwerden wurde zwar längst widerlegt. Dennoch wird lokaler Blutentzug auch in der modernen Medizin bei bestimmten Indikationen als sinnvoll oder notwendig gesehen, etwa in der Chirurgie zur Behandlung von venösen Stauungen und anschließender Thrombose. Diese stellen „ernsthafte und gefürchtete Komplikationen nach der Transplantation von Hautlappen und der chirurgischen Rekonstruktion von Gliedern“ (Michalsen & Roth 2012) dar. Diese, vermutlich einmalige, Kombination der pharmakologischen und Blut entziehenden Wirkung der Blutegeltherapie ist mittlerweile anerkannt und etabliert. Darüber hinaus beschreiben blutegelerefarene Therapeuten eine große Zahl von Indikationen und Therapien, bei denen sie mit Blutegeln erfolgreich behandeln konnten. Darauf soll hier nicht weiter eingegangen werden, da der Bedarf an wirksamen Blutegeln für die moderne Medizin, von wem und wofür auch immer angewandt, evident ist. Exemplarisch eine Auflistung typischer Indikationen in Tabelle A2 im Anhang.

#### **1.1.4 Versorgung des Marktes und wirtschaftliche Notwendigkeiten**

Der Blutegel ist ein Arzneimittel, das bisher nicht ersetzbar ist. Daraus resultiert die arzneimittelrechtliche Notwendigkeit, Blutegel in ausreichender Zahl und hoher Qualität zur Verfügung zu stellen. Durch die Einordnung als Fertigarzneimittel werden entsprechende Anforderungen an das Produkt gestellt, die bei einer Herstellung zu erfüllen sind. Unbedenklichkeit, Qualität und Wirksamkeit des Arzneimittels Blutegel sind sicherzustellen. Da nur ein wirtschaftlich arbeitender Betrieb gewerbsmäßig Blutegel vermehren und somit die Versorgungssicherheit gewährleisten kann, muss der Herstellprozess ökonomischen Kriterien genügen.

## **1.2 Herstellungstechniken, Produktqualität**

Bei der Vermehrung von Blutegeln sind unterschiedliche Wege möglich. Die Tiere können in natürlichen Teichen eingesetzt, gelegentlich gefüttert und für die Verwendung gefangen werden. Diese extensive Haltungsförm wurde in Mitteleuropa früher in Weihern, Viehtränken und anderen Stillgewässern praktiziert. Gefüttert wurde üblicherweise mit lebenden, oft kranken oder alten Wirbeltieren (Pferden, Schweinen, Rindern, Schafen, etc.). Heute wird eher das andere Extrem, die Intensivhaltung in Gläsern, Wannen und Aquarien praktiziert (wie für die bbez beschrieben, s. 1.2.3). Die abiotischen Parameter wie Licht, Wasser und Temperatur sind dabei vollständig steuer- und kontrollierbar. Die Vorteile der Intensivhaltung liegen in der vollständigen Kontrollierbarkeit während des gesamten Produktionszyklus der Tiere. Auch sind in kleineren Einheiten im Kalamitätsfall die Verluste gut einzugrenzen. Im Arzneimittelrecht

werden Chargen betrachtet und bewertet. Bei einer Aufteilung der Bluteigel in kleine Gruppen, die separat etwa in Gläsern gehalten werden, wird spätestens in der Quarantäne der Besatz jedes Glases zu einer Charge. Eine regelmäßige stichprobenartige Überprüfung, etwa der mikrobiologischen Situation, führt bei einer Haltung in Gläsern aber schnell zu unverhältnismäßigen Kosten und Verlusten, da jede Charge beprobt werden muss. Je kleiner die Anzahl der Individuen pro Charge ist, desto höher ist der relative Verlust je Beprobung. Gleichzeitig steigen mit der Anzahl der Chargen Kosten und Aufwand für die Dokumentation. Auch aus biologischer Sicht erscheint die Haltung in kleinen Behältnissen wenig sinnvoll. Da die Tiere das Haltungswasser durch Stoffwechselprodukte oder auch Erbrechen von Fütterungsblut insbesondere mit Stickstoffverbindungen (Ammonium, Nitrit, Nitrat) belasten, muss dieses regelmäßig gereinigt oder gewechselt werden. Dies führt zu einem kontinuierlichen Anstieg der Konzentration der N-Verbindungen, die durch den Wasserwechsel abrupt fallen und daraufhin wieder stetig ansteigen. Dieser sich sägezahnartig ändernde Konzentrationsverlauf bedeutet vermutlich Stress für die Tiere, dem sie zwar durch Verlassen des Wassers temporär entgehen können, der aber für ein dauerhaftes Wohlbefinden abträglich sein dürfte. Dies zeigen Beobachtungen bei entsprechend gehaltenen Tieren. Haben die Tiere Wasser mit guter Qualität, ruhen sie meist am Boden liegend, soweit möglich versteckt. Sagen ihnen die Verhältnisse im Wasser nicht zu, hängen sie meist oberhalb der Wasseroberfläche an der Gefäßwand. Alternativ hierzu wird im Rahmen dieser Arbeit die Haltung in hydraulischen Einheiten entwickelt und untersucht. Hierbei werden die Tiere in Aquarien gehalten, die an einen (gemeinsamen) Wasserkreislauf einschließlich eines aktiven biologischen und/oder technischen Filtersystems angeschlossen sind. Dadurch steigt das Wasservolumen insgesamt an, Schwankungen durch Einzelereignisse, wie z.B. Erbrechen von Fütterungsblut einzelner Tiere, fallen schwächer aus. Der Filter kann Stickstoffverbindungen abbauen und so die Wasserqualität stabilisieren. Eine weitere mögliche Alternative ist die ständige Einspeisung von temperiertem Frischwasser bei gleichzeitigem Ablauf der gleichen Menge Mischwassers.

Als wichtiges Kriterium für die herzustellenden Bluteigel, die als Arzneimittel der Volksgesundheit dienen sollen, taucht der Begriff „Qualität“ auf. Auch das zentrale Steuerungsinstrument für die betrieblichen Prozesse, das Qualitätsmanagement, stellt die Qualität in das Zentrum. Etymologisch hat der Begriff seinen Ursprung im lateinischen *qualitas* = Eigenschaft, Beschaffenheit, Merkmal, Zustand. Je nach Zusammenhang wird er sehr unterschiedlich verwendet. Aus dem üblichen Ausdruck „unterschiedliche Qualitäten“ geht hervor, dass es nicht einen bestimmten Zustand, eine Eigenschaft, o. ä. gibt, die als Qualität zu bezeichnen ist. Die

DIN 55350, Teil F, beschreibt Qualität als „... die Gesamtheit von Eigenschaften und Merkmalen eines Produktes oder einer Tätigkeit, die sich auf deren Eignung zur Erfüllung gegebener Erfordernisse beziehen ...“. (Beuth 2008). Darüber hinaus soll das Produkt klar definierte unerwünschte Eigenschaften und Merkmale nicht besitzen. Daraus folgt, dass die Qualität des Produktes definiert werden muss, wenn man sie als Parameter herbeiziehen will. Liegt diese Definition vor und ist sie mit messbaren oder klar beschreibbaren Kriterien gefüllt, lässt sich feststellen, ob das Produkt den Qualitätsanforderungen genügt, ob also die Qualität gut ist oder eben nicht gut. Auch bei der Definition der Kriterien sind unterschiedliche Herangehensweisen machbar. Hersteller neigen dazu, Qualität aus ihrer eigenen Sicht bezüglich Machbarkeit etc. zu definieren. Marktorientierte Betriebe definieren die Qualität zusätzlich aus der Sicht des Kunden, wodurch weitere Kriterien relevant werden. Bei Arzneimitteln kommen die Behörden als Quelle zusätzlicher Kriterien hinzu.

Ähnlich verhält es sich mit dem Begriff Hygiene. Der etymologische Ursprung ist griechisch und leitet sich von *Hygiéia*, der für die Gesundheit zuständigen Göttin, ab. Die heute übliche Definition für den Begriff Hygiene ist die „Lehre von der Verhütung der Krankheiten und der Erhaltung, Förderung und Festigung der Gesundheit“ (Gundermann et al. 1991). Der Begriff der Gesundheit bezieht sich im Fall der Blutegelproduktion sowohl auf die Mitarbeiter in der Produktion als auch die Therapeuten, deren Gesundheit zu erhalten ist, sowie andererseits auf die Patienten, deren Gesundheit unterstützt oder verbessert werden soll und die Blutegel selber, ausgehend von der Annahme, dass nur gesunde Blutegel im Sinne der Therapie optimal wirken können. Qualitativ hochwertige und hygienisch unbedenkliche Blutegel als Arzneimittel zur Verfügung zu stellen ist folglich eine dynamische Anforderung.

### **1.2.1 In der Literatur beschriebene Herstellverfahren**

Heutige Blutegelhersteller beschreiben ihre Herstellungsverfahren nicht öffentlich zugänglich. Im Rahmen eines Zulassungsverfahrens muss der Herstellprozess beschrieben werden, die dazu eingereichten Unterlagen werden aber vertraulich behandelt. Daher gibt es lediglich historische Beschreibungen der Haltung, Vermehrung und Zucht von medizinischen Blutegeln.

Beispielhaft sei hier eine Beschreibung aus Brehms Tierleben von 1929 wiedergegeben:

„Die Zucht der Tiere ist nicht so einfach, wie man glauben möchte. Vor allem muß dafür Sorge getragen werden, daß das Wasser des Egelteiches zur Zeit der Eiablage nicht steigt, denn wenn die Kokons, die etwa 10 bis 12 cm über dem Wasserspiegel abgelegt werden,

nur 24 Stunden unter Wasser geraten, gehen sie ein. Schwierigkeit bereitet auch die Fütterung, denn da die grausame Methode, ein altes Pferd oder ein anderes dem Verderben geweihtes Tier in den Teich zu treiben und von den Egel zu Tode saugen zu lassen, nicht mehr erlaubt ist, muß man ihnen auf andere Weise Blut zuführen. Glücklicherweise brauchen die älteren Tiere nur einmal im Jahre gefüttert zu werden, während die jungen sich an Frösche halten. Daß der Züchter seine Pfleglinge auch gegen ihre zahlreichen Feinde, in erster Linie Wasserspitzmäuse, Ratten, Schwimmkäfer und deren Larven, schützen muß, ist selbstverständlich.“ (Taschenberg & Schmidt 1929)

Andere historische Darstellungen beschreiben ähnliche Techniken. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Blutegelzucht zwar durchaus gewerblich, aber auf eher extensive Weise betrieben wurde. Aus heutiger Sicht war das Wissen um die gezielte Haltung und Vermehrung zu dieser Zeit offenbar noch marginal. Dennoch finden sich punktuell durchaus interessante Hinweise.

### **1.2.2     Haltungs- und Vermehrungsverfahren anderer Hersteller**

Auch wenn die Verfahren, die andere Hersteller anwenden, von ihnen bis heute (2016) nicht genauer beschrieben werden, sind doch Details bekannt. Russische Hersteller, die Blutegel nicht im rechtlichen Sinn als Arzneimittel herstellen, halten die Blutegel während ihrer gesamten Entwicklung, vom Kokon bis zum Verkauf, ebenso wie Elterntiere, in klaren Glasflaschen mit ca. fünf Litern Volumen. Die Flaschen sind teilweise in Regalen, teilweise in Paternostersystemen untergebracht. Die Paternostersysteme reduzieren den Flächenbedarf, benötigen aber hohe Räume. Die Gläser sind mit ca. vier Litern Wasser befüllt. Die Öffnung wird mit Stofflappen und Gummiringen verschlossen. Da in solch kleinen Gefäßen das Wasser regelmäßig gewechselt werden muss, stellen die Paternoster eine erhebliche Arbeitserleichterung dar. Die Flaschen müssen nur jeweils um ca. 20 cm vor und zurück bewegt werden, ein Heben ist nicht notwendig. Die Temperatur im Arbeitsbereich wird in diesen Räumen auf ca. 20°C gehalten. Wasserwechsel werden aufgrund der Beurteilung der Mitarbeiter durchgeführt, chemische Wasserparameter werden dafür nicht gemessen. Elterntiere werden zur Kopulation und Kokonablage in gesonderten Räumen untergebracht. Diese Räume sind mit etwa 25°C deutlich wärmer als die vorgenannten Räume. Hier stehen geschlossene Schränke, in denen die Gläser dunkel untergebracht sind. Als Substrat werden feuchte Torfknollen verwendet, zwischen denen die Blutegel ihre Kokons ablegen. Circa fünf Elterntiere werden in jedes Glas eingesetzt. Der verwendete Torf ist pH-neutral.

Gefüttert wird mit unbehandeltem Rinderblut, als Membran wird der Dünndarm des Rindes verwendet. Dieser wird über einen runden Rahmen gezogen, so dass ein oben offener Zylinder mit dem Darm als Boden entsteht. Der Zylinder wird so in das Blut eingetaucht, dass keine Luft zwischen Membran und Blut verbleibt. Die Blutegel werden in den Zylinder auf die Membran gesetzt und saugen das Blut durch diese nach oben auf.

Andere russische Hersteller halten die Tiere in Kunststoffwannen mit ca. 50 Litern Inhalt. Diese sind in ein Paternostersystem eingehängt, sie sind zu schwer für eine Handhabung ohne maschinelle Unterstützung. Das Flüchten der Blutegel wird mit festen Deckeln verhindert. Etwa 25 Liter Wasser befinden sich in jeder Wanne. Kippmechanismen erleichtern den Wasserwechsel, der manuell durchgeführt wird. Abgesehen von den Behältern erfolgen Haltung, Fütterung und Vermehrung analog zu den Betrieben mit Gläserhaltung. Auch die Temperaturen sind vergleichbar. Über die chemische Zusammensetzung des verwendeten Wassers in den beiden Betrieben ist nichts bekannt. Hergestellt werden ausschließlich *H. verbana*. Informationen stammen aus eigener Anschauung von Betrieben in St. Petersburg, Moskau und Balakovo, sowie aus Gesprächen mit den jeweiligen Inhabern.

### **1.2.3 Etabliertes Verfahren der Biebertaler Blutegelzucht (bbez)**

Die bbez praktiziert eine Haltungsform, bei der die Blutegel zumindest zeitweise unter Bedingungen gehalten werden, die an die Bedingungen im natürlichen Lebensraum der Tiere angelehnt sind. Dabei muss eine möglichst optimale Wasserqualität im Sinne der Ansprüche der Blutegel sicher zu stellen sein. Daher werden die Blutegel in langen Perioden ihres Lebens, einschließlich der achtmonatigen Quarantäne vor dem Verkauf, in Teichen gehalten. Hier liegt das Verhältnis von Blutegel zu Wasser bei ca. 2,5 g/l, in Gläsern hingegen bei ca. 40 g/l. Zum Verkaufen werden sie aus den Teichen einzeln heraus gefangen. Sind vermehrungsfähige Blutegel in den Teichen und stimmen die Rahmenbedingungen, paaren sie sich und legen Kokons ab. Die Kokons werden abgesammelt und in Bruträume gebracht. Die juvenilen Blutegel schlüpfen aus den Kokons unter kontrollierten Bedingungen in Aquarien oder Kunststoffwannen mit ausreichend Wasser. Um sie vor Austrocknung zu schützen, werden die Kokons mit Moos (*Sphagnum*) oder feuchter Erde umgeben. Nach dem Schlüpfen aus den Eiern verzehren die jungen Blutegel den im Kokon vorhandenen Dotter, verlassen anschließend den Kokon und gehen ins Wasser. Die Teiche haben Wasseroberflächen zwischen 3,5 und 33 qm. Die Abdichtung wird in der Erdgrube mit glasfaserverstärktem Kunststoff (GfK) hergestellt. Die Teichwände sind rd. 40 cm über die Bodenoberfläche herausgehoben. Der Wasserkörper ist mit

Pflanzen bewachsen. Der Bewuchs variiert je nach Jahreszeit und dient verschiedenen Zwecken:

- Bepflanzte Teiche sind leichter in ein biologisches Gleichgewicht zu bringen/ zu halten.
- Blätter, Stängel und Wurzeln werden von Blutegeln als Ruhe- und Aufenthaltsort genutzt.
- Pflanzen sorgen tagsüber für eine Anhebung des Sauerstoffgehaltes.
- Pflanzen sorgen für Beschattung.
- Pflanzen legen Nährstoffe fest und verbessern so die Wasserqualität.
- Pflanzen dienen als Indikatoren hinsichtlich der Wasserqualität.
- Pflanzen machen den Teich für Menschen ästhetisch ansprechender, die Teiche verbessern somit das Betriebsklima und das Erscheinungsbild des Betriebes.

Der Besatz wird so ausgelegt, dass für die Blutegel genügend Wasservolumen zur Verfügung steht. Es sind feuchte Erdzonen vorhanden, in denen sich Blutegel aufhalten und Kokons ablegen können. Die Wassertiefe variiert je nach Teich zwischen 20 und 60 cm und ist variabel einstellbar. Eine Umwälzpumpe fördert kontinuierlich Teichwasser durch einen biologischen Filter, in dem Mikroorganismen bestimmte organische Verbindungen oxidieren oder mineralisieren. Als Siedlungssubstrat für die Mikroorganismen dient poröses Tuffgestein. Eine regelmäßige Kontrolle der relevanten physikalischen und chemischen Parameter stellt dauerhaft eine für die Blutegel zuträgliche Wasserqualität sicher. Falls Grenzwerte über- oder unterschritten werden, gibt ein Kalamitätenplan Anweisung zu den erforderlichen Maßnahmen. Der Lebenszyklus der Blutegel wird in Tabelle 2 dargestellt. Sie zeigt, in welchen zeitlichen Abständen in der bbez gefüttert wird und somit, dass die Belastung des Wassers mit Blut und Ausscheidungsprodukten nur in großen Abständen erfolgt.

Bei der Fütterung der Blutegel werden künstliche Membrane und defibriniertes Blut verwendet. Zu beobachten ist, dass Blutegel nach Fütterungen häufig Teile der Mahlzeit wieder erbrechen. Das führt bei der in der Zucht üblichen Haltung in kleineren Gefäßen (Gläsern, Aquarien, Wannen) zu einer Verunreinigung des Haltungswassers, die sorgfältig beseitigt werden muss. Dieses Erbrechen erfolgt bis zu mehrere Monate nach der Futteraufnahme und ist nicht vorhersehbar. Mechanisches Handling, Stress, aber auch Habitatwasser mit erhöhter Konzentration an Ausscheidungsprodukten oder Blut führen, insbesondere bei kleineren Blutegeln und in Kombination, zum Erbrechen. Daher ist ein Monitoring der Wasserparameter sinnvoll, Grenzwerte lassen sich aber bisher nicht festlegen, da es sich anscheinend um multifaktorielle Auslöser handelt. Die Blutegel sind in der Lage, unter sauerstoffarmen Bedingungen zu überleben (Herter 1968). Sinkt der Sauerstoffgehalt im Haltungswasser, könnten (fakultativ) anaerobe

Bakterien (Clostridien, *Citrobacter* spp. Morganellen u.a.) gefördert werden, wogegen die egelassoziierten aeroben Arten (Aeromonaden u.a.) im Wachstum gehindert werden könnten. Die Anaerobier können bei den Blutegel eventuell zu einem erhöhten Infektionsdruck führen.

Gefüttert werden die Blutegel in größer werdenden Abständen. Eine verkaufsreife Größe haben die Tiere mit ca. 0,75 bis 1,5 Gramm, entsprechend den Wünschen der Kunden. Nach der Fütterung der Blutegel werden sie in Gläsern gehalten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Grundschemata der Bluteigelvermehrung in der bbez im zeitlichen Verlauf; Angabe der Verkaufsreife unter Berücksichtigung des Gewichtsverlustes während der anschließenden Quarantäne, ohne Berücksichtigung der Verluste durch Versterben.

<b>Ca. Alter der BE in Wochen</b>	<b>Aktivität</b>	<b>Ort/e</b>	<b>Verkaufsreif, % der Gesamtzahl (ca.)</b>
Schlupf		Wanne, Aquarium	Gesamtanzahl (100%)
1.	1. Fütterung	Aquarium	
1.- 4.	Haltung, Pflege	Glas	
4.	2. Fütterung	Aquarium	
4.- 10.	Haltung, Pflege	Glas	
10.	3. Fütterung	Aquarium	
10.- 28.	Haltung, Pflege	Glas	
28.	4. Fütterung	Aquarium	
			ca. 10% verkaufsreif
28.- 60.	Quarantäne	Teich	ca. 10%
28.- 44.	Haltung, Pflege	Glas	
44.	5. Fütterung	Aquarium	
			ca. 10% verkaufsreif
44.- 76.	Quarantäne	Teich	ca. 10%
44.- 64.	Haltung, Pflege	Glas	
64.	6. Fütterung	Aquarium	
			ca. 50% verkaufsreif
64.- 96.	Quarantäne	Teich	ca. 50%
64.- 84.	Haltung, Pflege	Glas	
84.	7. Fütterung	Aquarium	ca. 30% verkaufsreif
84.- 116.	Quarantäne	Teich	ca. 30%

Das Wasser wird nahezu täglich gewechselt, um die entstandenen Verdauungsprodukte und erbrochenes Blut zu entfernen. In der Produktion findet der Wasserwechsel auf Grund individueller Beurteilung der betreuenden Person statt. Hierzu werden mehrere Kriterien herangezogen: Wasserfarbe, Geruch, Verhalten der Blutegel, etc. Da es sich um bis zu mehrere hundert Gläser handelt, die eine Person betreut, unter denen die relevanten Parameter erheblich voneinander abweichen können, ist eine Objektivierung (Messung der Wasserparameter Nitrit, Nitrat, Ammonium, pH, etc.) im laufenden Betrieb nicht möglich. Daher bleibt die Entscheidung für oder gegen den Wasserwechsel subjektiv. Eine Folge davon ist, dass unzuträgliche Wasserqualität immer wieder nicht rechtzeitig erkannt wird. Automatisierte Teilwasserwechsel sind in solchen Systemen nur unabhängig von der objektiven Wasserqualität möglich, etwa durch ständigen Zu- und Ablauf. Hierbei wird Wasser und Energie verbraucht, da das notwendige Temperaturniveau in der Haltung über der Leitungswassertemperatur liegt ( $\Delta T$  ca. 8-10°C). Ein bedarfsgerechter Wasserwechsel mittels Onlinemessung und entsprechender Steuerung ist bisher zu teuer, zumal es sich um eine erhebliche Zahl von Behältern handelt.

Blutegel sind in der Lage, durch Öffnungen ab ca. 0,5 mm zu entkommen. Da sie insbesondere nach einer Mahlzeit gezielt enge Räume suchen, in die sie sich zurückziehen können, sind kleine Öffnungen für sie attraktiv (s. 1.1.1.3). Insbesondere Wasserabläufe müssen daher gut gesichert werden, um ein Abwandern zu vermeiden. Dies geschieht in der bbez durch feine Edelstahlsiebe. Blutegel geben regelmäßig Hautschläuche und Schleim ab, die die feinen Siebe verstopfen können, was zum Überlaufen der Behälter führen kann.

Dass Tiere in Vermehrungsbetrieben sterben, ist vermutlich unumgänglich. Wie viele Jungtiere überleben hängt auch von der jeweiligen Art ab. S. Utevsky (2012) hat hierzu die Überlebensraten der drei Arten *H. orientalis*, *H. medicinalis* und *H. verbana* untersucht. Diese Untersuchung weist für *H. verbana* die höchste Sterblichkeitsrate unter den drei Arten auf (Abbildung 2). Im Laufe der Produktion entstehen erhebliche Verluste an Blutegeln, bevor diese eine verkaufsfähige Größe erreichen. Das Sterben der Tiere erfolgt meist im unmittelbaren zeitlichen Zusammenhang mit den Fütterungen, die bis zum Erreichen der Verkaufsreife bis zu sieben Mal stattfinden. Das in der bbez praktizierte Produktionsverfahren wurde umfassend analysiert, um Störstellen im Produktionsprozess zu identifizieren.

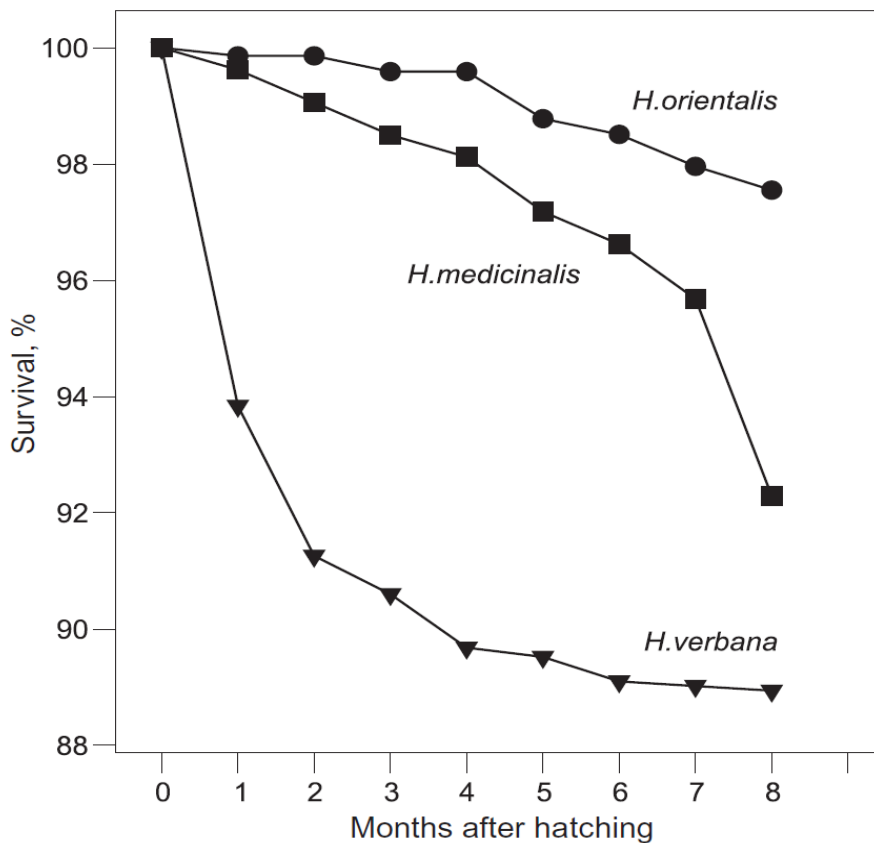


Abbildung 2: Überlebensrate der drei Arten *Hirudo orientalis*, *H. medicinalis*, und *H. verbana* unter künstlichen Haltungsbedingungen (Utevsky 2012).

### 1.3 Analyse des Produktionsverfahrens

#### Vorbemerkung

In dem in der bbez etablierten Produktionsverfahren wurden die Herstellungsschritte und Faktoren einzeln und in ihrer Kombination darauf untersucht, ob sie für die Blutegelgesundheit relevant sein könnten. Solche, die einen negativen Einfluss haben könnten, wurden mit den in den natürlichen Habitaten vorkommenden Verhältnissen verglichen und auf, unter Intensivhaltung mögliche, Optimierung untersucht. Technische und betriebsökonomische Faktoren wurden dabei betrachtet. Bei der Planung der Versuchsanlagen wurde eine mögliche Umsetzung in großtechnische Verhältnisse berücksichtigt.

Rund 70-80 % der in den Zuchtbetrieben geborenen Jungegel versterben erfahrungsgemäß, bevor sie verkaufsfähig sind, auch andere Blutegelzüchter berichten dies. Der Einsatz von Ressourcen (Wasser, Energie, Arbeitskraft) ist entsprechend hoch.

Die folgenden Analysen beruhen auf Erfahrungen, die in der Haltung und Zucht in der bbez gemacht wurden, soweit sie nicht anderweitig kenntlich gemacht sind.

### **1.3.1 Analyse von Haltungsfaktoren und Verlustquellen**

#### **Chemische Wasserqualität**

In den natürlichen Habitaten der Bluteigel haben ihre Verdauungsprodukte keinen nennenswerten Einfluss auf die Wasserqualität, dazu sind zu wenige Bluteigel und damit Exkrememente pro Einheit Wasservolumen vorhanden. Anders ist das unter künstlichen Haltungsbedingungen bei Bluteigelzüchtern. Dort wird eine große Anzahl von Tieren gleichzeitig gefüttert. Diese bleiben auch nach der Nahrungsaufnahme im selben Wasser zusammen. Die Verdauung und eventuelles Erbrechen finden bei vielen Tieren etwa zeitgleich statt.

Bei der Vermehrung der Bluteigel stellen die Phasen ab den Fütterungen die sensibelsten Zeitpunkte dar, hier sterben die meisten Bluteigel. Als Auslöser kommen die mit der (Blut-)Fütterung und der Verdauung verbundenen Faktoren in Frage: Stickstoffprodukte (Ammonium, Nitrit, Nitrat) und Bakterien im Haltungswasser. Da der Bluteigel das Wasser verlassen kann, kann er sich einer ihm abträglichen Wasserqualität zumindest zeitweise entziehen. Schwieriger ist das für juvenile Bluteigel. Durch ihre geringe Körpermasse (ca. 0,025 g nach der ersten Fütterung) dehydrieren sie sehr schnell und verlassen das Wasser daher meist nur kurz. Sind insbesondere die Stickstoffabbauprodukte in erhöhter Konzentration im Wasser vorhanden, bilden die Tiere innerhalb weniger Tage Krankheitssymptome aus, z. B. Einschnürungen, Verkrümmungen und rote Bäuche. Außerdem erbrechen sie weit häufiger aufgenommenes Fütterungsblut als bei niedrigerer Konzentration, dies betrifft insbesondere die Nitritkonzentration.

#### **Temperatur**

Wie in 1.1.1 erwähnt, sind Bluteigel wechselwarm und sehr temperaturtolerant. Temperaturen unter der Frostgrenze ertragen sie vorübergehend, ab einer Temperatur von 39°C agieren sie verschreckt, unruhig. Je nach Aktivitätsphase sind die Temperaturoptima unterschiedlich (Herter 1968).

#### Jagdphase

Unterhalb einer Temperatur von ca. 10°C sind Bluteigel kaum frei schwimmend anzutreffen. Wenn sie sich bewegen, dann nur träge und nicht aktiv nach möglicher Beute suchend. Zufallsbegegnungen mit einem potentiellen Wirt können dennoch zu einem Beißvorgang führen, es

dauert dann aber sehr lange, bis der Blutegel sich festsetzt und beißt. Erst ab einer Temperatur von ca. 12°C sind die Tiere im normalen Umfang aktiv auf der Suche nach Nahrung. In dieser Phase werden sie unter kontrollierter Haltung gefüttert.

### Verdauungsphase

Hat ein Blutegel in seinem natürlichen Habitat eine Mahlzeit aufgenommen, zieht er sich zurück, so dass er möglichst im Dunkeln und rundum in Kontakt mit einem Schutz bietenden Material ist. Er versteckt sich unter Objekten im Wasser wie Steinen, Pflanzenteilen, oder auch anderen Gegenständen (auch wegen möglichen Kannibalismus). Hat er, etwa in Intensivhaltung, diese Möglichkeit nicht, clustern häufig mehrere Tiere (Abbildung 3).

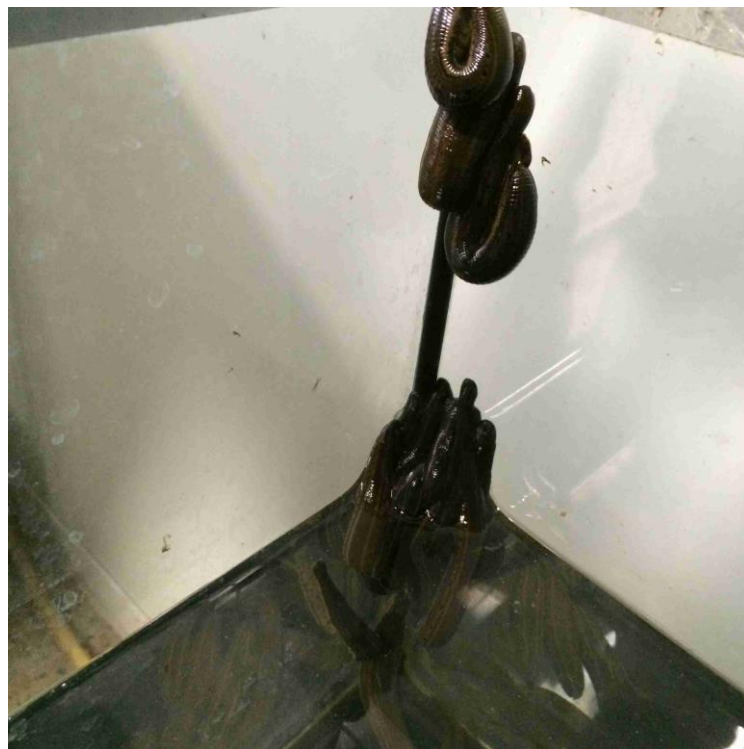


Abbildung 3: Cluster aus Blutegeln

Die Temperatur spielt dabei keine wesentliche Rolle. Die symbiotischen Bakterien in seinem Verdauungstrakt arbeiten bei niedrigen Temperaturen langsamer oder gar nicht mehr. Die optimale Temperatur in der Verdauungsphase liegt bei  $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (Auswertung eigener Untersuchungen).

### Kopulationsphase

Kopuliert wird erst ab einer Wassertemperatur von etwa 12°C aufwärts. Obwohl die Tiere bei diesen Temperaturen eher träge sind, spielen offenbar weitere Auslöser eine zusätzliche Rolle: Sättigungszustand, Tageslänge, Kopulationsbereitschaft anderer Blutegel. Die Paarung findet

generell im Wasser statt, wenn auch meist in flachem. Außerhalb des Wassers lassen sich Paarungen nur in seltenen Ausnahmen beobachten.

### Kokonablage

Kokons werden meist erst ab Temperaturen oberhalb von 20°C abgelegt, höhere Temperaturen animieren offenbar. Der optimale Bereich liegt zwischen 22°C und 28°C. In der bbez gibt es im Monat August einen starken Anstieg der Kokonzahlen, innerhalb von 6-8 Wochen werden mehr als 50% der jährlichen Kokons erzeugt und gefunden (Auswertung eigener Versuche und Zahlen).

### Schlüpfen der juvenilen Tiere aus dem Kokon

Jungegel, die den im Kokon vorhandenen Dotter verzehrt haben, schlüpfen nicht unbedingt sofort. Sie können durchaus mehrere Wochen im Kokon bleiben, wenn ihnen die Umweltbedingungen nicht zusagen, etwa wenn es zu kalt ist. Es wurde auch wiederholt beobachtet, dass Jungegel den Kokon kurzzeitig verlassen, um wieder dorthin zurück zu kehren. Als untere Temperaturgrenze wurde in der bbez 17°C beobachtet. Hierbei handelt es sich allerdings nicht um die Wassertemperatur, da die Kokons zwar im feuchten Milieu, aber außerhalb des Wassers abgelegt werden. Meist sind sie in von den Blutekeln selbst gebohrten Erdgängen, im Moos, in Torf oder ähnlicher Umgebung zu finden. Sie werden abgesammelt und in Räume mit Schlupfwannen gebracht.

### Überwinterung

Blutekel überleben problemlos Phasen, in denen die Temperatur im Teich oder der Erde, in die sie sich zurückgezogen haben, auf unter 0°C sinkt.

Bei einem eigenen Versuch wurden 5 Tiere innerhalb einer Stunde von +6°C auf -4°C heruntergekühlt und unmittelbar anschließend innerhalb 1 Stunde wieder auf +6°C gebracht. Sie haben das ohne Anzeichen für übermäßigen Stress verkraftet. Erfolgt das Auftauen nicht zu abrupt, sind sie nach kurzer Zeit wieder im normalen Maße aktiv (Auswertung eigener Versuch).

Zu berücksichtigen ist, dass die Nitritoxidierer, die Nitrit zu Nitrat oxidieren, erst ab einer Temperatur von 5°C arbeiten. So lange Nitrit im Wasser in einer relevanten Menge vorhanden ist, sollte die Temperatur des Wassers nicht unter diese 5°C fallen, um eine Nitritanreicherung zu vermeiden (EPA 2011).

Es ist ohne großen Aufwand möglich, die Blutekel in der jeweils optimalen Temperatur zu halten.

## **pH-Wert**

Untersuchungen in den uns bekannten Fanggebieten für *H. verbana* haben dagegen gezeigt, dass die natürlichen Habitats meist leicht basisches Wasser mit einem pH zwischen 7,3 bis 8,5 aufweisen (Tabelle A3). Somit erscheint das in Biebertal vorhandene Wasser aus dem öffentlichen Trinkwassernetz geeignet und wird entsprechend verwendet. Alle im Folgenden gemachten Angaben zu pH beziehen sich auf das jeweilige Wasser.

## **Bedeutung des Stickstoffkreislaufs bei der Haltung von Blutegeln**

Stickstoff ist mit rd. 78% Hauptbestandteil der Atmosphäre und Bestandteil vieler organischer Verbindungen, unter anderem von Eiweiß. Einige Mikroorganismen sind in der Lage, gasförmigen, molekularen Stickstoff in pflanzenverfügbare Verbindungen der Biosphäre umzuwandeln (Stickstofffixierung). Weitere Mikroorganismen führen die Denitrifikation durch, wodurch der gebundene Stickstoff aus der Biosphäre in gasförmiger Form wieder in die Atmosphäre zurückgeführt wird.

Bei der Fixierung von molekularem Stickstoff bilden Mikroorganismen Ammoniak und Ammonium, nitrifizierende Mikroorganismen (Nitrifikanten) oxidieren Ammonium und Ammoniak zu Nitrationen. Pflanzen können diese wieder zu Ammoniak reduzieren und in Form von Eiweißen festlegen, denitrifizierende Mikroorganismen (Denitrifikanten) wiederum können Ammoniak zu gasförmigem Stickstoff reduzieren, der zurück in die Atmosphäre gelangt, indem sie Nitrat zu Stickstoffoxiden und molekularem Stickstoff umwandeln. Dies geschieht unter sauerstoffarmen Bedingungen (Nitratatmung), in den meisten aquatischen Systemen im Bodensubstrat oder dem Mulm. Somit wird der für das Leben essentielle Stickstoff in einem Kreislauf zwischen Organismen und der Atmosphäre ständig umgewälzt (Purves et al. 2006). In vielen technischen Anlagen findet eine Denitrifizierung nicht statt, da keine anaeroben Bereiche existieren.

## **Ammonium $\text{NH}_4^+$ und Ammoniak $\text{NH}_3$**

Bauen Mikroorganismen organische Stickstoffverbindungen, etwa Eiweiße, im Wasser um, entstehen zuerst Ammonium und Ammoniak in einem Verhältnis, das vom pH-Wert des Wassers abhängt. Bei pH 7 entsteht Ammonium und Ammoniak in einem Verhältnis von 99:1, bei pH 9 liegt das Verhältnis bei 70:30. Bei einem pH unter 7 liegt Ammoniak so gut wie gar nicht vor, unter pH 6 kommt allerdings auch die Nitrifikation nahezu zum Erliegen (Udert et al. 2003). Da Ammoniak für die meisten aquatischen Lebewesen toxisch ist und in der Raumluft auch für die Mitarbeiter problematisch, sollte der Ammoniakgehalt möglichst niedrig bleiben.

Ein möglichst neutrales Wasser erscheint daher vorteilhaft. Ammonium dagegen ist für die meisten Tiere unproblematisch. Beides wird von den Nitrifikanten genannten Bakterien weiter oxidiert zu Nitrit und dann Nitrat. Ammonium kann in der Blutegelhaltung auf über 50 mg/l steigen, ohne dass die Tiere zwingend Stressanzeichen zeigen (Auswertung eigener Versuche).

### **Nitrit $\text{NO}_2^-$**

Nitrifikanten erster Ordnung im Wasser oxidieren Ammonium zu Nitrit. In aquatischen Systemen, etwa für Fische, ist Nitrit meist toxisch. Besonders nach einer Fütterung mit Blut steigt der Nitritgehalt in dem Habitatwasser schnell an. Wasseraufbereitungssysteme oder auch Wasserwechsel sollen einen zu starken Anstieg verhindern. Nitrit kann in der Blutegelhaltung über 40 mg/l steigen, ohne dass die Tiere zwingend Stressreaktionen zeigen.

### **Nitrat $\text{NO}_3^-$**

Nitritoxidierer im Wasser oxidieren Nitrit zu Nitrat. Diese Mikroorganismen benötigen dazu eine Mindestwassertemperatur von 5°C (EPA, 2011). Nitrat ist, im Gegensatz zu Nitrit, für die meisten Wasserlebewesen nicht toxisch, es dient Pflanzen als Nährstoff. Denitrifikanten reduzieren Nitrat über Nitrit durch anaerobe Veratmung (Nitrat dient dabei als alternativer Elektronakzeptor) zu gasförmigem Stickstoff, der dem Wasser entweicht. Nitrat kann bei der Haltung über 400 mg/l steigen, ohne dass die Blutegel zwingend gestresst oder beeinträchtigt erscheinen. Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine steigende Nitratkonzentration die Tiere zunehmend lethargisch werden lassen könnte.

## **Sauerstoffgehalt, Härtegrade und Metalle im Haltungswasser**

Blutegel sind nicht zwingend auf im Wasser gelösten Sauerstoff angewiesen, da sie das Wasser verlassen und über die Haut Luftsauerstoff atmen können. Sie können über längere Zeit in Wasser mit 0,15 mg O<sub>2</sub>/l auskommen (Sawyer 1986). Ihr Sauerstoffverbrauch wird mit 0,2-0,5 µl/g/h (entspricht 0,3-0,7 mg O<sub>2</sub>/g/h) angegeben (Sawyer 1986). Der Sauerstoffgehalt in den Gläsern und Wannen nimmt mit beginnender Ammoniumoxidation ab, durch täglichen Wasserwechsel schwankt er sehr stark. In den Teichen spielt dieser Vorgang aufgrund des höheren Wasservolumens, der größeren Wasseroberfläche, der Wasserbewegung, der Bepflanzung und der wesentlich geringeren Ausscheidungen der Blutegel keine wesentliche Rolle, der relative Sauerstoffgehalt bleibt nahezu immer oberhalb von 50% (eigene Messungen der bbez). Der mittlere Härtegrad des verwendeten Leitungswassers (11,5°dH) hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Blutegel. Das verwendete Leitungswasser liegt mit 0,196 mg/l Eisen nahe am Grenzwert der Trinkwasserverordnung (0,2 mg/l, TrinkwV. Anlage 3 Teil I), andere Metalle sind unauffällig. Ein negativer Einfluss des Eisens wird nicht vermutet.

## **Licht**

Generell bevorzugen Blutegel abgedunkelte Verhältnisse. Beobachtungen zeigen, dass Blutegel sich in verschiedenen Zyklen an unterschiedlichen Orten aufhalten. Nach der Nahrungsaufnahme ziehen sie sich möglichst an geschützte, enge und dunkle Orte zurück. Hier kann eine zu häufige oder zu starke Belichtung Stress bedeuten. Die Tageslänge, für Organismen üblicherweise durch die Sonnenscheindauer erkennbar, kann bei dem circannualen Vermehrungsrhythmus der Tiere erheblichen Einfluss haben. Eine entsprechende Beleuchtung der für die Haltung genutzten Räume kann eventuell eine verschobene Jahreszeit simulieren und einen Auslöser zur Kokonablage darstellen. Eigene Versuche mit einer simulierten Sommertagsbeleuchtung, sowohl in Bezug auf die Lichtfarbe einschließlich Farbverlaufs, als auch der Tageslänge, zeigen, dass der circannuale Rhythmus verschoben werden kann. Sind die Blutegel in der Jagdphase, müssen sie als tagaktive Tiere in offenes, somit auch helles Wasser. Sowie sie satt sind, ziehen sie sich bevorzugt wieder in abgedunkelte Bereiche zurück, unter Steine oder andere im Wasser vorhandene Gegenstände, oder bohren sich in die Erde bzw. das Substrat. So schützen sie sich vor Fressfeinden, aber auch Belichtung. Insbesondere ihre ventrale Seite schützen sie aktiv vor zu starker Belichtung. Werden sie in einem Aquarium von unten beleuchtet, drehen sie sich auf den Rücken, eine Stellung, die sonst selten zu beobachten ist. Setzt man Blutegel intensiver Belichtung mit kurzweiligem Licht aus, kann man sie innerhalb kurzer Zeit töten. Anscheinend behindert kurzweiliges Licht die Sauerstoffaufnahme. Blutegel reagieren

darauf erregt oder erstarren. Worauf die Behinderung der Sauerstoffaufnahme beruht ist bisher nicht bekannt (Herter, 1968, Sawyer, 1986). Die Kopulation findet überwiegend in den hellsten Monaten Juni bis August und auch im Hellen statt, Licht wird hierbei offenbar nicht als störend empfunden. Außer für die Kopulation und bei der Jagd sind dunklere Verhältnisse eher förderlich. Die Kokonablage sollte möglichst nicht durch Belichtung gestört werden.

### **Verluste in Folge von Fütterungen**

Zurzeit werden in der bbez Blutegel mit Blut von Schlachttieren (Pferden) gefüttert. Pferde, die für den Verzehr durch den Menschen vorgesehen sind, müssen einen Equidenpass zugeordnet bekommen, in dem das Tier als „Zur Schlachtung bestimmt“ wurde. In diesen Pass werden alle relevanten tierärztlichen und medikamentösen Behandlungen mit zugehöriger Wartezeit eingetragen (Europäische Kommission, 2015). Dadurch soll gewährleistet sein, dass der Tierkörper und das Blut für den menschlichen Verzehr geeignet sind. Das in der bbez verfütterte Blut stammt ausschließlich von „Zur Schlachtung bestimmt“(en) Pferden.

Verfüttert wird bei der bbez auf Grund interner Regelung Blut nur in den ersten 24 Stunden nach der Schlachtung. Die kurz nach der Schlachtung einsetzende Hämolyse macht das Blut schnell untauglich für die Blutegel. Hämolyse bezeichnet den Zerfall der Erythrozyten, ausgelöst durch eine Reihe von chemischen Substanzen, oder auch Enzymen, die von Bakterien herühren (Eder, 2003). Diverse Bakterien lassen sich auf Blutagar gut kultivieren, vermehren sich daher auch in mit Blut versetztem Wasser gut, selbst wenn dieses gekühlt wird.

Der Equidenpass alleine lässt aber keine Aussage darüber zu, ob das Blut für die Fütterung der medizinischen Blutegel geeignet ist. Aus Sicherheitsgründen (Arzneimittel) ebenfalls notwendig ist eine Überprüfung des Blutes auf bestimmte Viren (Tollwut-, Reo-, Influenza-A-, Equines Herpesvirus). Die Erfahrung zeigt, dass sich das Blut qualitativ durchaus als ungeeignet erweisen kann, so dass die Tiere erhebliche Mengen wieder erbrechen, erkranken oder sterben. Schnell feststellbare und eindeutige Kriterien, nach denen die Eignung im Vorhinein beurteilt werden kann, fehlen bisher. Alle uns bekannten Züchter von Blutegeln berichten davon, dass im Anschluss an eine Fütterung Tiere versterben, in der Literatur ist hierzu nichts Substanzielles zu finden. Als Verlustrate wird in diesem Zusammenhang meist 10% je Fütterung angegeben und als normal eingeordnet. Ob die Ursache physiologischer Natur (Überfressen o. ä.) ist, in der Wasserqualität liegt, oder mikrobielle Gründe hat, ist in der Literatur bisher ungeklärt.

Aufgrund eigener Beobachtungen erscheint wahrscheinlich, dass die mikrobiologische Situation kombiniert mit Stress dazu führen, dass die Tiere einen Teil der Blutmahlzeit wieder von

sich geben (erbrechen), erkranken oder auch versterben. Als Folge des Vomierens wachsen die Tiere langsamer und müssen folglich öfter gefüttert werden.

Vermutlich ist der, im Vergleich mit dem natürlichen Fressvorgang, physiologisch unterschiedliche Vorgang beim Fressen von dargereichtem Blut ein wichtiger Auslöser für das Vomieren. Beim Beiß- und Saugvorgang am lebenden Tier werden üblicherweise kapillare Blutgefäße erreicht, so dass aktiv mittels Unterdruck Blut gesaugt wird. Dagegen reicht es bei der Darbietung von Fütterungsblut in medizinischen Schutzhüllen, wenn der Blutegel mittels seiner zahnbesetzten Kiefer eine Öffnung in die Membrane schneidet. Der zur Nahrungsaufnahme notwendige Unterdruck ist hierbei sehr viel geringer, wenn das Blut nicht sogar aufgrund des statischen Drucks selbsttätig in den Blutegel fließt. Der Saugvorgang ist dann deutlich kürzer und der Blutegel muss sich, nach dem Biss, kaum oder gar nicht mehr anstrengen.

### **Verluste durch Erkrankung**

Krankheiten der Blutegel werden in der Literatur beschrieben und decken sich mit den Beobachtungen in der bez.

Rotbauch (red venter disease): Tiere zeigen einen auffällig roten Bauch, teilweise oder auch vollständig; Septikämie, Gewebeerstörung im Bereich der Nephridien; tritt meist kurz nach der Fütterung auf.

C-Krankheit: Tiere krümmen sich in C-Form und verenden.

Gelbsucht: Tiere bekommen gelbliche Hautfärbung, werden lappig, vorderer Saugnapf hart und blutig; Ursache vermutlich zu hohe Temperatur.

Metallkrankheit: Tiere zeigen unruhige, krampfartige Bewegungen und sterben in einer Art Tetanus; vermutete Ursache: Bakterien, schlechte Wasserqualität, evtl. Schwermetalle im Wasser.

Ruhr: übermäßige Blutaufnahme kann zu Darmentzündung führen; Tiere verenden mit abschnittsweise aufgequollenem Leib.

Einschnürungen: der Körper zeigt an mindestens einer, oft mehreren Stellen eine Art Taillierung; in wenigen Fällen ist dies auf nicht vollständig abgestreifte Haut zurückzuführen; da

diese Erscheinung in vielen Fällen wenige Tage nach der Fütterung auftritt, ist ein Zusammenhang zu vermuten. Auflistung in Anlehnung an Herter (1968), ergänzt durch eigene Beobachtungen.

Insgesamt ist bemerkenswert, dass über die Auslöser von Krankheiten beim Blutegel bislang kaum etwas bekannt ist. Bisher ist keine der Krankheiten einem Erreger oder einem Wasserparameter konkret zugeordnet worden. Auszugehen ist von einer additiven Auslöserkette: Sind etwa bestimmte chemische Wasserwerte erhöht und ist der Infektionsdruck durch pathogene Bakterien hoch, ist das Immunsystem überfordert, die Tiere zeigen Symptome und erkranken. Regelmäßig zeigt sich, dass sich Blutegel in der Zucht nur selten erholen, wenn Symptome einmal erkennbar sind. Etwas anders verhält sich dies, wenn erkrankte Tiere in einen Teich mit ausschließlich natürlicher Abdichtung (z.B. Ton) gesetzt werden. In diesen Teichen werden relativ viele gesunde, kräftige Tiere gefunden, obwohl nur kranke eingesetzt wurden. Offenbar wirkt das Substrat, in das sie sich vermutlich einbohren, bei bestimmten Erkrankungen heilsam. Blutegel, die im Substrat versterben, werden nicht wieder gefunden, da sie in kurzer Zeit nahezu vollständig zersetzt werden. Untersuchungen zu diesem Phänomen wurden bisher nicht angestellt.

### **Verluste durch Fressfeinde, Parasiten und andere Faktoren**

Da die Blutegel im Produktionsprozess überwiegend in Gläsern, Wannen und Aquarien gehalten werden, sind sie für Fressfeinde unerreichbar. Erst wenn sie für die Quarantänezeit in die Teiche gesetzt werden, können Fressfeinde sie ggf. angreifen. Bisher sind nur wenige Fressfeinde für größere Blutegel bekannt. Waschbären und Siebenschläfer in Winterruhepausen holen sich gelegentlich Blutegel aus Außenteichen, auch Saatkrähen wurden vereinzelt schon dabei beobachtet. Da sie auch als Angelköder genutzt werden (Herter 1968), kommen auch Fische als Fressfeinde infrage. Die Kokons werden von Wasserasseln *Asellus aquaticus* geöffnet und der enthaltene Dotter sowie die Eier gefressen. Noch unbekannt ist die Schädigung der Blutegel durch Parasiten. In den Blutegeln wurden schon Metazerkarien gefunden, die aber verkapselt waren und keine erkennbare Schädigung der Blutegel zur Folge hatten. Ebenfalls gefunden wurden im Umfeld der Blutegel Hüpferlinge (*Cyclops*) sowie Öltröpfchenwürmer (*Aelosoma variegata hemprichi*). Bei beiden ist bisher unklar, ob sie für Blutegel, insbesondere junge Blutegel, eine Gefährdung darstellen können. Beobachtungen deuten zumindest auf eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens hin, da insbesondere junge Blutegel deutlich häufiger

oberhalb der Wasserlinie hängend anzutreffen sind, wenn die Parasiten in relevanter Zahl vorkommen. Die Parasiten können den Blutekeln dorthin nicht folgen. Die Beobachtungen legen daher eine wirtschaftliche Bedeutung der Parasiten nahe.

Die größte Bedrohung für den Blutekel besteht im Austrocknen. Wenn er sich zu lange in trockener Umgebung aufhält, verdunstet er den wässrigen Anteil der Körpersäfte über die Haut und dehydriert bis zum Tod. In der Praxis kommt das insbesondere dann vor, wenn Blutekel die für sie vorgesehenen Behälter (Gläser, Wannen, Teiche, etc.) verlassen und dann nicht schnell genug eine feuchte Umgebung finden. Ein äußerlicher Schutz vor Austrocknung ist nicht möglich, da sie verhaltensbedingt ist. Dass Blutekel sich gerne zurückziehen bedeutet auch, dass sie auf der Suche nach Rückzugsmöglichkeiten umherwandern. Deshalb sind funktionierende Fluchtsperren sehr wichtig für Blutekelzüchter und -halter. Da Blutekel insbesondere nach der Nahrungsaufnahme, aber auch sonst, dazu neigen, sich in engste Stellen zu drücken, reichen ihnen auch winzige Lücken oder Öffnungen um dem für sie vorgesehenen Behälter zu entkommen. Dabei können sie durchaus auch Abdeckungen etwa von Behältern anheben. Da bei Arzneimitteln generell die Chargentrennung gilt, sind Blutekel, deren Chargenzugehörigkeit nicht eindeutig zu klären ist, zu töten, es entsteht also ein wirtschaftlicher Schaden.

### **Stressfaktoren**

Bei höheren Lebewesen gibt es eine physiologische Definition für Stress, messbar etwa in der Ausschüttung von Adrenalin, Noradrenalin, oder Cortisol. Wenn in dieser Arbeit der Begriff Stress verwendet wird, beruht die Erkennung von Stress bei den Blutekeln nicht auf entsprechenden Messwerten, sondern auf Beobachtungen, die die Mitarbeiter machen und als Stress deuten. Blutekel zeigen unter verschiedenen Bedingungen Stressreaktionen, werden unruhig, versuchen zu flüchten, clustern möglichst so, dass die Tiere gemeinsam eine möglichst kleine ungeschützte Oberfläche bieten (in Ecken, Winkeln, ungeordneten Zusammenballungen), bewegen sich unruhig, ohne auf Nahrungssuche zu gehen, nehmen ungewöhnliche Körperhaltungen ein, oder erstarren.

Eine Gewöhnung an bestimmte Störungen und damit verminderte Stressreaktion, kann bisher nicht beobachtet werden. Es werden im Folgenden nur mögliche Stressauslöser aufgelistet und kurz erläutert, die es zu vermeiden oder minimieren gilt:

- Physische Störungen, etwa beim Fangen der Tiere, Reinigen der Gläser, Aquarien, etc.
- Abrupter Temperaturwechsel; auch wenn die Tiere dem durch Verlassen des Wassers entgehen können, wird nach Wasserwechsel ohne sorgfältige Temperaturangleichung Unruhe beobachtet.
- Abrupte Änderung der chemischen Wasserwerte (einschl. des pH); dies betrifft insbesondere die Änderung bei der Reinigung der Behälter mit Wasserwechsel; es gilt bezüglich des Verhaltens das Gleiche wie bei Temperaturwechsel, wobei die Reduzierung der belastenden Inhaltsstoffe (insbesondere Stickstoffabbauprodukte, s. o.) gewollt ist.
- Starke Beleuchtung; (die Gefahr für den Blutegel wurde oben erwähnt).
- Unruhe, Störungen; wenn die Tiere nicht im Jagdmodus sind, wollen sie möglichst in Ruhe gelassen werden und bewegen sich freiwillig fast nur auf der Suche nach Rückzugsmöglichkeiten. Sind sie kurz vor oder bei der Kokonproduktion, führen Störungen meist zum Abbruch der Eiablage oder zu unvollständigen Kokons.
- Fehlende Versteckmöglichkeiten; wie beschrieben möchten die Tiere sich in bestimmten Phasen so zurückziehen können, dass möglichst maximaler Körperkontakt zum schützenden Objekt bzw. Medium besteht (Thigmotaxis). Wird diese Möglichkeit in den Haltungsgefäßen nicht geboten, neigen sie zur Clusterbildung. Zur Minimierung der Außenfläche findet die Clusterbildung meist in Raumecken statt.

Darüber hinaus kommen weitere Stressfaktoren in Frage, wie starker Besatz, Erschütterungen im Umfeld und andere (Tabelle 3). Hierfür wurden bisher keine Kriterien benannt.

Tabelle 3: Abiotische Stressfaktoren (eigene Beobachtung).

<b>Stressreaktion</b>	<b>Mögliche Ursachen</b>
Flucht	Gewitterneigung, schlechte Wasserqualität, Suche nach Versteckmöglichkeit
Unruhe (keine Nahrungssuche)	Erkrankung, Gewitterneig., starke Temperaturwechsel, Manipulationen am Haltungsgefäß, Störungen
Erstarrung	Zu hohe Temperatur, Erkrankung
Clustern	Fehlende Rückzugsmöglichkeit
Verlassen des Wassers	Gewitterneig., schlechte Wasserqualität, Sauerstoffarmut
Erbrechen	Gewitterneig., hoher Gehalt von Stickstoffabbauprodukten des Wassers, überhöhte Nahrungsaufnahme
Unruhe, Erstarrung, Tod	Starke Belichtung
Erkrankungen, Einschnürungen	Abrupte Milieuänderung, erhöhte Nitritkonzentration
Lethargie	Abrupte Milieuänderung, erhöhte Nitratkonzentration
Reduzierte Kopulations- und Kokonablagebereitschaft	Unruhige Umgebung, Erschütterungen, u. a. Störungen

Direkt nach der Fütterung haben die Bluteigel ein erhöhtes Bedürfnis nach ungestörter Ruhe. Häufige Wasserwechsel und sonstige Eingriffe führen zu Unruhe, Stress und in der Konsequenz zu Verlusten. Selbst wenn die Bluteigel nicht unmittelbar sterben, wachsen sie doch langsamer, was einen Verlust bedeutet. Sie müssen evtl. öfter gefüttert werden als stressarm aufgezogene Tiere.

### **Einrichtung der Haltungsgefäße**

Sind die Bluteigel weder hungrig noch kopulationsbereit, haben sie das Bedürfnis, sich zu verstecken. Bietet das jeweilige Behältnis ihnen dazu keine Möglichkeit (z. B. in Gläsern oder Aquarien ohne entsprechende Ausstattung), clustern sie zeitweise in Gruppen bis zu ca. 100 Tieren. Solche Cluster können tagelang nahezu unverändert bestehen bleiben. Als Versteckmöglichkeiten können in Aquarien verschiedene Objekte eingesetzt werden, in Gläsern ist dies kaum möglich. Chips aus Teichfolie haben sich bei kleinen Bluteigeln als praktikable Variante erwiesen. Größere Tiere ziehen sich gerne auch unter umgedrehte Teller, Tontöpfe und vergleichbare Objekte zurück. Auch Tonziegel-Mauersteine mit engen Kammern (ca. 10 x 30 mm) werden gerne angenommen. Generell werden dunkle Objekte helleren vorgezogen.

Kommen Bluteigel nach der Fütterung in einen Teich, ziehen sie sich in feuchte Erde (Uferbereich, auch submers), zwischen oder unter Steine oder in vorhandenes Substrat zurück und gehen in eine Art Energiesparmodus mit möglichst wenig Bewegung. Erst wenn sie wieder hungrig werden oder kopulieren wollen, sind sie vermehrt frei schwimmend im Wasser anzutreffen.

## **1.4 Methodischer Leitfaden und Hypothese**

Bluteigel werden in der bbez ausschließlich mit Blut gefüttert und leben überwiegend in Behältnissen (Gläser, Aquarien, Wannen) mit Wasser. Die Behältnisse sind, im Vergleich zu dem natürlichen Umfeld der Tiere, klein. Entsprechend klein ist das zur Verfügung stehende Wasservolumen. Die Fütterung mit Blut führt mittelbar und unmittelbar zu einer Belastung des Wassers mit verschiedenen Substanzen und Organismen, darunter Stickstoffabbauprodukte und Bakterien. Beides konzentriert sich teilweise schnell auf, die Wasserqualität ändert sich und führt kurzfristig zu Umweltbedingungen für die Bluteigel, die stark von ihren natürlichen abweichen. Die zum Teil großen Verluste an Bluteigeln, die insbesondere im Zusammenhang mit den Fütterungen auftreten, hängen vermutlich mit diesen kurzfristigen und wiederkehrenden

Änderungen der Haltungsbedingungen zusammen. Diese Zusammenhänge wurden für die vorliegende Arbeit erstmalig untersucht.

Da im Zusammenhang mit der Fütterung eine Zunahme der Konzentration der N-Produkte im Haltungswasser zu erwarten war und Fische und andere aquatische Wirbeltiere insbesondere auf Nitrit empfindlich reagieren, werden die Stickstoffabbauprodukte im Haltungswasser der Bluteigel vordringlich betrachtet. Weil die Haltung in kleinen Wasservolumina zwar ergonomisch gut zu handhaben ist, die Konzentration eingebrachter Stoffe aber sehr schnell steigt, stellen Kreislaufsysteme eine möglich Alternative dar. Sie erhöhen das Wasservolumen, dämpfen Schwankungen, gleichen Konzentrationsdifferenzen aus und führen beim Handling zu weniger Störungen der Bluteigel. Auch können in Kreislaufsystemen biologische Filter integriert werden. Daher werden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Wasserbehandlungstechniken parallel untersucht. Zur Bewertung werden verschiedene Parameter regelmäßig erhoben und die Effizienz der Techniken anhand der Rate gesunder Bluteigel nach Versuchsende evaluiert.

Arbeitshypothese war daher, dass eine Wasserbehandlung in zirkulierenden Systemen mit zusätzlichen Wasserreservoirs mehrere Störfaktoren zumindest mindern können:

- Konzentrationen von z.B. N-Produkten verändern sich langsam.
- Temperaturschwankungen erfolgen langsam.
- Mikrobiologische Situation ändert sich langsam.
- Störungen der Bluteigel in den Behältern werden minimiert.

Es sollten daher Wasserbehandlungssysteme verglichen werden, um ihre Eignung für den Einsatz in der Bluteigelhaltung bewerten zu können.

Hypothese: Bluteigel in Wasserkreislaufsystemen mit integrierter Wasserbehandlung zu halten optimiert die Wasserqualität und reduziert Stress für die Tiere; somit können Erkrankungen und Verluste bei Intensivhaltung minimiert werden.

## **1.5 Zielsetzung**

Die Lebens- und Umweltansprüche der Bluteigel sollten in der Intensivhaltung so gut wie möglich erfüllt werden. Der gesamte Produktionsprozess muss sich daran orientieren. Als überwiegend im Wasser lebende Organismen spielt für die Bluteigel die physikalische, chemische und mikrobiologische Wasserqualität eine wesentliche Rolle.

Mit dieser Arbeit wird erstmals vergleichend die Haltung und Zucht von *H. verbana* wissenschaftlich untersucht, mit dem Ziel, technische Lösungen zu erforschen, die skaliert und in den Produktionsprozess des Betriebs übertragen werden können. Dazu soll die vorliegende Arbeit folgende Fragen beantworten:

- Welche Rolle spielen Stickstoffabbauprodukte im Wasser für die Gesundheit der Bluteigel?
- Wie lassen sich Stickstoffabbauprodukte wirksam in einem egelverträglichen Rahmen halten?
- Spielen weitere Stressfaktoren eine Rolle für die Gesundheit der Bluteigel?
- Spielen wasserassoziierte Bakterien eine Rolle für die Gesundheit der Bluteigel?
- Wie beeinflusst die Blutfütterung wasserassoziierte Bakterien?
- Sind zirkuläre Wassersysteme geeignet, um Bluteigel aufzuziehen?
- Welche der verfahrenstechnischen Wasserbehandlungstechniken sind geeignet, die Lebensbedingungen der Bluteigel in Intensivhaltung zu verbessern?

Es wurden verschiedene Wasserbehandlungsverfahren in Versuchsdurchläufen getestet:

- Absenkung des pH-Wertes im Haltungswasser mittels
  - Eichenextraktzugabe
  - Einblasung von Kohlendioxid
- Reduzierung der Konzentrationen der Verdauungsausscheidungen der Bluteigel im Haltungswasser mittels unterschiedlicher Filtertechniken
- Veränderung der Bakterienzusammensetzung durch technische Hygienisierung mittels:
  - Ozonisierung
  - Hochfrequenzbestrahlung
  - UV-Bestrahlung

Die Versuchsdurchläufe wurden überwiegend mit einer Fütterung der Bluteigel im jeweiligen Milieu und einer Abschlussbewertung der Tiere abgeschlossen. Die Bewertung erfolgte hinsichtlich der Zahl überlebender und gesunder Tiere, ihrem Gewicht und Vitalität. Daraus wurden Schlüsse gezogen bezüglich notwendiger Veränderungen im technischen Aufbau und der Umsetzbarkeit der geeigneten Technik für den Einsatz in einem Arzneimittelherstellbetrieb. Zusätzlich wurden Fragen, insbesondere hinsichtlich der wechselseitigen Beeinflussung von Bluteigeln, ihrem Fütterungsmedium Blut und der wasser- und egelassoziierten Bakterien, aufgeworfen, die es künftig zu bearbeiten gilt.

Der in der Bluteigelhaltung und -aufzucht kritischste Zeitraum beginnt mit der Fütterung der Tiere mit Blut. In den ersten Tagen und Wochen nach der Fütterung erkranken und sterben Bluteigel häufig. Zu diesem Zeitpunkt kommt zu den Haltungsbedingungen, an die sich die Bluteigel bis dahin gewöhnt haben könnten, ein starker zusätzlicher Eintrag von Ausscheidungsprodukten und Blut. Die stark veränderte Zusammensetzung des Haltungswassers bietet wiederum Bakterien geänderte Bedingungen, wodurch die Bakterienzusammensetzung im Haltungswasser verändert wird. An solche Veränderungen sind Bluteigel aus ihrem natürlichen

Umfeld nicht gewöhnt und vermutlich nicht angepasst, woraus eventuell Erkrankung und Tod von Tieren resultieren könnte. Der Einsatz von Antibiotika in der Blutegehaltung und -zucht erscheint höchst kritisch und wird daher bei der bbez nicht praktiziert, es werden daher andere Wege gesucht, die Blutegele gesund zu erhalten.

Bei der Konzeption des Vorversuchs (Pilotversuch) wurde besonderen Wert darauf gelegt, mit relativ geringem Aufwand Hinweise zu möglicherweise erfolgversprechenden verfahrenstechnischen Varianten der Behandlung des Haltungswassers der Blutegele zu erlangen.

## 2 **Material und Methoden**

In einem ersten Schritt wurden die Produktionsprozesse analysiert und eine Pilotanlage konstruiert und aufgebaut, die grundlegende Informationen über verschiedene Wasserbehandlungstechniken liefern sollte. Teilaspekte dieser Fragestellung wurden zusätzlich im Rahmen einer Diplomarbeit untersucht. Hierzu wurde eine Versuchsanlage als Pilotanlage aufgebaut und ausgewertet (Haubenschild 2013). Die Pilotanlage sollte Hinweise darauf geben, in welche Richtung die Haltung optimiert werden könnte. Sie konnte auf Grund des Versuchsaufbaus keine wissenschaftlich belastbaren Aussagen treffen. Darauf aufbauend wurden drei verbesserte Haltung- und Wasserbehandlungsanlagen installiert, die systematisch, auch im Versuchsverlauf, optimiert wurden. Über insgesamt 34 Monate wurden die Behandlungstechniken und die Gesundheit der Blutegel untersucht. Alle Versuche wurden mit *H. verbana* durchgeführt.

### 2.1.1 **Aufbau der Pilotanlage, Fütterungen und Blutegel**

Die im Folgenden genannten fünf Wasserbehandlungstechniken wurden für den Pilotversuch in separaten Systemen aufgebaut (Abbildung 4). Die Blutegel in den Anlagen wurden gefüttert und der Versuch wurde mit einer abschließenden Bewertung der Blutegel abgeschlossen.

- EE-Anlage: Ansäuerung des Haltungswassers mittels Eichenextrakt
- Bio-Anlage: Filterung über einen großen Biofilter (ca. 600 l Volumen)
- HF/UV-Anlage: Bestrahlung des zirkulierenden Wassers mit Hochfrequenz (HF) und ultraviolettem Licht (UV)
- O<sub>3</sub>-Anlage: Ozonisierung des zirkulierenden Haltungswassers
- Kontroll-Anlage: Filterung über einen kleinen Kanister-Biofilter

In den fünf Anlagen wurden die Blutegel in je zwei rahmenlose Aquarien Typ A (L/B/H: 350/800/400 mm, Glasstärke 6 mm) in einem Holzregal eingesetzt (Egelaquarien), die bei einer Wasserhöhe von 250 mm mit jeweils 70 Litern Wasser befüllt wurden. Das Wasserniveau wurde mittels eines einstellbaren Überlaufes konstant gehalten. Dieser Überlauf wurde durch ein gelochtes Edelstahlsieb (Lochweite 0,5 mm) gegen Ausbruch der Blutegel gesichert. In jedes Egelaquarium wurden 200 etwa gleich große Blutegel aus einer Grundgesamtheit eingesetzt. Als Filterbecken und Pumpensumpf dienten rahmenlose Aquarien Typ B (L/B/H: 600/600/300 mm, Glasstärke 6 mm). Sie wurden mit Aufwuchssubstrat für Bakterien befüllt. Die Wasserführung erfolgte durch PVC-Rohre und handelsübliche Wasserschläuche (Trico-tech, Fa. Schwarz + Dibbern, Pohlheim).

Als Aufwuchssubstrat für abbauende Bakterien (Destruenten, Nitrifikanten, Denitrifikanten) in den jeweiligen Filtern diente Tuffschotter der Körnung 16/56 (Firma Menz Naturbaustoffe, Wiesbaden), ein Material, das wegen seiner Porigkeit häufig in Filtern eingesetzt wird. Als Vorbereitung der Filter („Impfung“) wurde Tuffschotter aus einem Filter entnommen, der an demselben Quarantäne-teich angeschlossen war, aus dem auch das Wasser für die Erstbefüllung entnommen wurde. Der Tuffschotter wurde immer vollständig geflutet. Die im selben Behälter wie der Tuffschotter eingesetzte Pumpe wurde mittels eines groben Schaumstofffilters vor dem Ansaugen von Tuffschotter geschützt. Das Wasser wurde aus der örtlichen Trinkwasserleitung bezogen.

Die Gesamtwasservolumina und die Durchflussraten je Aquarium wurden in den Anlagen unterschiedlich eingestellt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Volumina und Durchflussraten in den Anlagen, Pilotversuch.

<b>Anlage</b>	<b>Gesamtwasservolumen l</b>	<b>Durchflussrate l/min</b>
EE-Anlage	185	1,5
Bio-Anlage	350	3,5
HF/UV-Anlage	360	3,5
O <sub>3</sub> -Anlage	200	3,5
Kontroll-Anlage	185	1,33

Gefüttert wurden die Blutegel mit frischem Pferdeblut, das von einem Pferdemetzger (Fa. H. Simon, Heuchelheim) bezogen wurde. Das Blut wurde in Heuchelheim mechanisch defibriert, in Biebertal auf ca. 38°C erwärmt, und in medizinische Schutzhüllen (RilaSon Schutzhülle, Fa. Amor Gummiwaren, Arnstadt, Art. 051.11) gefüllt dargeboten.

Die Erstbefüllung der Anlagen mit Leitungswasser (Gemeinde Biebertal) und Wasser aus einem Quarantäne-teich im Verhältnis 1:2 fand am 01.08.2012 statt, während dessen wurde eine Wasserprobe aus dem Zulaufstrom genommen und physikalisch-chemisch sowie mikrobiologisch untersucht. Nach Befüllung der Anlagen und Einbindung der Komponenten (Pumpen, Reaktoren, Filtersubstrat, etc.) wurden sämtliche Funktionen getestet, die Durchflussraten eingestellt und die Systeme auf Undichtigkeiten untersucht. In jedes der zehn Aquarien wurden

200 H. verbanda aus einer Charge (Grundgesamtheit, im Mittel 0,7g) eingesetzt. Geplant wurde eine Versuchsdauer von zehn Wochen, vom 01.08.2012 bis zum 10.10.2012. Am letzten Tag sollten noch einmal alle Wasserwerte bestimmt und Proben für die mikrobiologischen Untersuchungen gezogen, sowie die Bluteigel ausgezählt werden.

Nach Beendigung des Versuchsdurchlaufs wurden die überlebenden Bluteigel gezählt und gewogen, im Versuchsverlauf wurden lediglich verstorbene Bluteigel aus den Aquarien entfernt und gezählt. Bei den verstorbenen Bluteigeln wurde zwar eine Beurteilung der vermuteten Todesursache durchgeführt, es wurde aber kein Zusammenhang der vermuteten Todesursache mit der Wasserbehandlungstechnik hergestellt.



Abbildung 4: Teilansicht der Pilotanlage

**2.1.1.1 EE-Anlage**

Aus den Egelaquarien (Typ A) wurde das zirkulierende Wasser in ein rahmenloses Aquarium Typ B geführt. Dieses wurde mit 3,1 kg Tuffschotter bestückt. Eine Tauchpumpe (Forza 8000, Fa. AquaForte) sorgte für die Kreislaufführung des Wassers durch Schläuche und PVC Rohre zurück in die beiden Egelaquarien. Die Ansäuerung wurde mittels manueller Zugabe von Eichenextrakt (Eichen-Zac-Plus, Fa. Zoo Zajak) auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt, täglich überwacht und bei Bedarf manuell nachdosiert (Tabelle 5, Abbildung 5).

Tabelle 5: Daten der Eichenextrakt-Dosierung in der EE-Anlage; EE = Eichenextrakt.

<b>Woche</b>	Datum in 2012	EE (ml)	<b>Woche</b>	Datum in 2012	EE (ml)
<b>1</b>	01.08. - 07.08.	15	<b>7</b>	12.09. – 18.09.	2 x 20
<b>2</b>	08.08. – 14.08.	2 x 10	<b>8</b>	19.09. – 25.09.	2 x 15
<b>3</b>	15.08. – 21.08.	2 x 15	<b>9</b>	26.09. – 02.10.	2 x 15
<b>4</b>	22.08. – 28.08.	2 x 15	<b>10</b>	03.10. – 09.10.	2 x 10
<b>5</b>	29.08. – 04.09.	2 x 20	<b>11</b>	10.10. – 15.10.	2 x 10
<b>6</b>	05.09. – 11.09.	2 x 20			

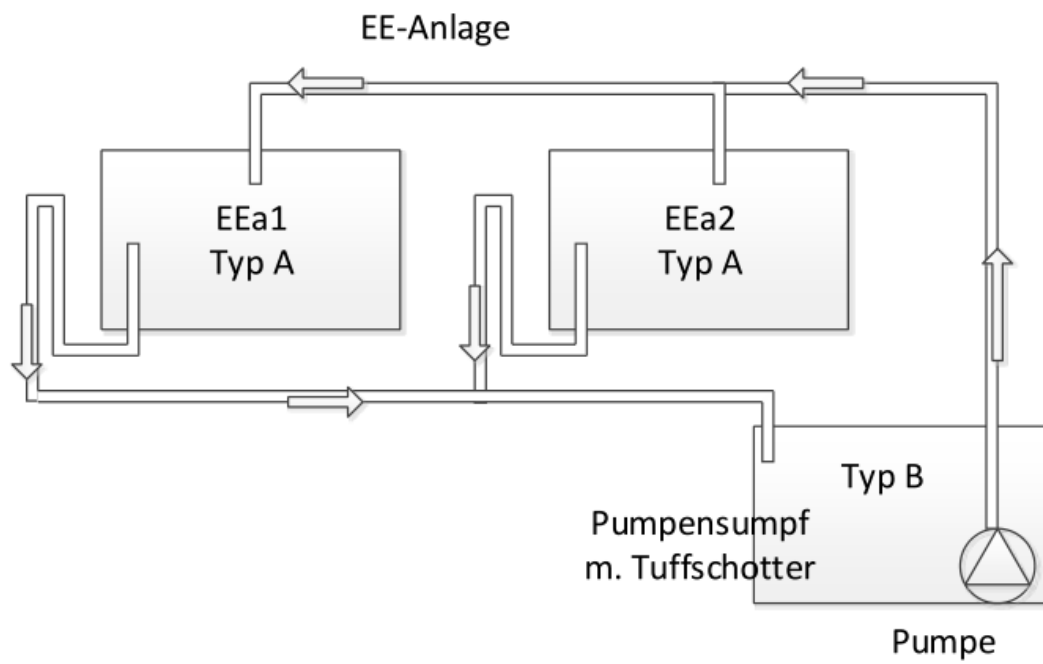


Abbildung 5: Hydraulisches Schema der EE-Anlage, Pilotversuch; EEax: x = Aquarienummer der EE-Anlage, Pfeile bezeichnen Fließrichtung, Aquariertypen sind im Text beschrieben.

### 2.1.1.2 Bio-Anlage

Das Wasser aus den Egelaquarien lief in eine glasfaserverstärkte Polyesterwanne (GfK, L/B/H: 1.120/1250/640 mm, Polyestertechnik Rafalzik), befüllt mit 30 kg Tuffschotter. Eine Tauchpumpe (AquaMax Eco 3500, Fa. Oase) sorgte für die Kreislaufführung des Wassers durch eine UV-Einheit (PondClear UV 15 Advantage, Tropical Marine Center Ltd., UV Strahler G15T8, Wellenlänge 253,7nm) und zurück in die Egelaquarien (Abbildung 6).

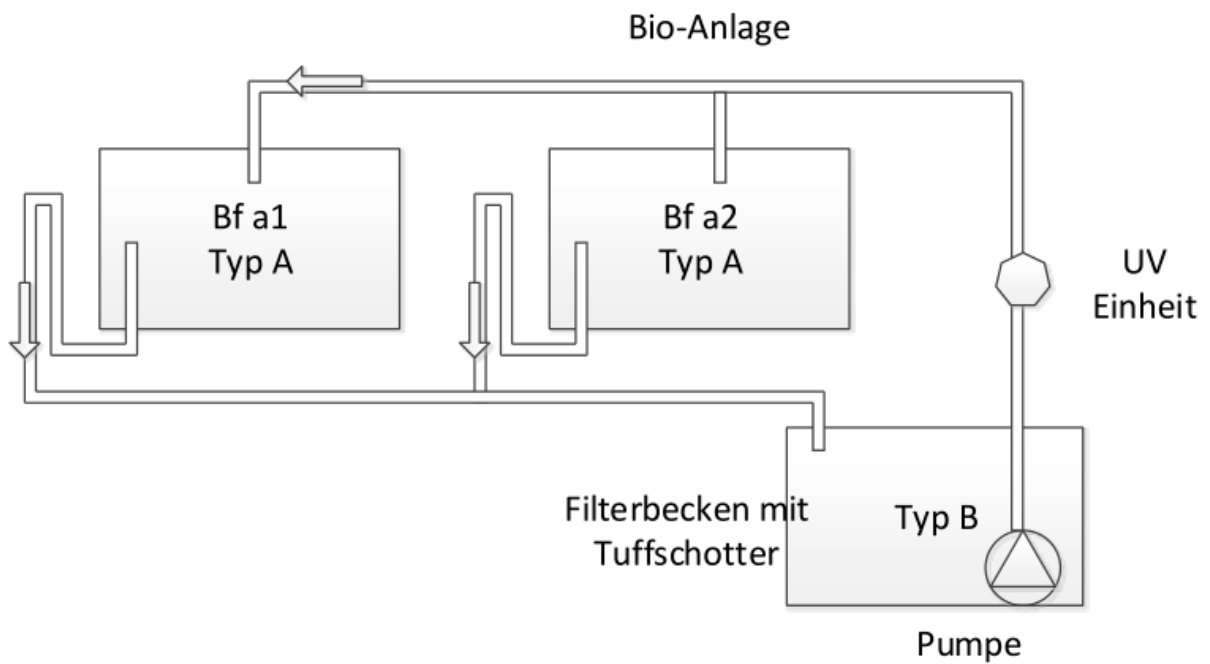


Abbildung 6: Hydraulisches Schema der Bio-Anlage, Pilotversuch; Bf<sub>x</sub>: x = Aquarienummer der Bio-Anlage. Pfeile bezeichnen Fließrichtung, Aquariertypen sind im Text beschrieben.

### 2.1.1.3 HF/UV-Anlage

Aus den Egelaquarien ablaufendes Wasser lief in eine Kunststoffwanne (L/B/H: 1.150/950/610 mm, Fa. Auer Packaging) mit 30 kg Tuffschotter. Eine Tauchpumpe (Forza 8000, Fa. Aqua-Forte) sorgte für die Kreislaufführung des Wassers in den kombinierten Hochfrequenz-(HF) und UV-Reaktor (SONOREX Technik AQ 5-1002.05, Fa. Bandelin electronic GmbH) und zurück in die beiden Egelaquarien (Typ A). Der HF-Generator emittiert Schall mit einer Frequenz von 25 kHz auf einer aktiven Länge von 250 mm, die UV-Einheit bestrahlt das Wasser mit einer Wellenlänge von 254 nm und hat eine elektrische Leistung von 20 W. Ein vorgeschalteter Feinfilter sorgt für hohe Transparenz des Wassers und minimiert die Ablagerung im Reaktor, so dass die Leistung beider Generatoren im Zeitverlauf langsamer abfallen soll (Abbildung 7).

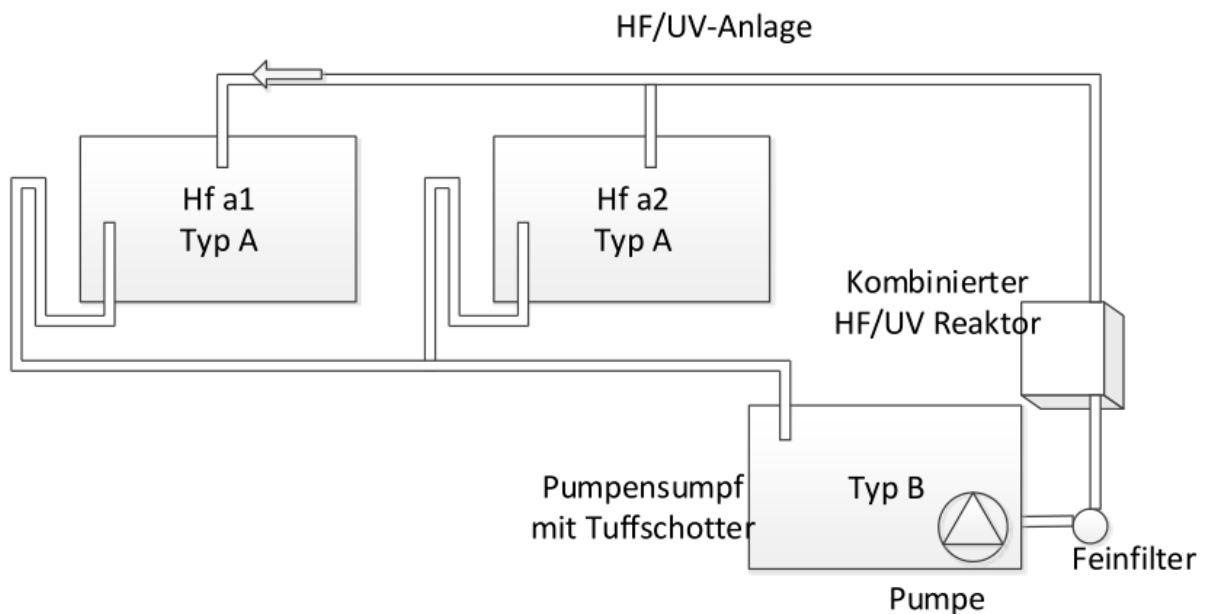


Abbildung 7: Hydraulisches Schema der HF/UV-Anlage, Pilotversuch; Hf<sub>x</sub>: x = Aquarienummer der HF/UV-Anlage. Pfeile bezeichnen Fließrichtung, Aquariotypen sind im Text beschrieben.

### 2.1.1.4 O<sub>3</sub>-Anlage

Das in das Aquarium Typ B (Pumpensumpf) ablaufende Wasser aus den Egelaquarien wurde mittels einer Tauchpumpe (Forza 8000) durch den Ozonreaktor sowie eine UV-Einheit (Pond-Clear UV 15 Advantage, Tropical Marine Center Ltd., UV-Strahler G15T8, Wellenlänge 253,7 nm) und zurück in die beiden Egelaquarien gepumpt. Ozon (O<sub>3</sub>) ist ein starkes Oxidationsmittel und wirkt deshalb desinfizierend. Der Ozonreaktor besteht aus einem Zylinder aus Polymethylmethacrylat (PMMA, Plexiglas) mit einem Durchmesser von 200 mm und einer Höhe von 700 mm. Wasser wird von oben zentrisch eingeleitet und unten seitlich ausgeleitet. Kunststofffüllkörper (zylindrisch mit vergrößerter Oberfläche, 10 mm Durchmesser) im Reaktor reduzieren die Fließgeschwindigkeit und bieten dem Ozon mehr Zeit und Kontaktfläche. Ozon wird zentrisch von unten in den Zylinder durch einen 4 mm Kunststoffschlauch eingeleitet und strömt im Gegenstrom durch den Reaktor. Ozon wird von einem Ozongenerator (Certizon C200, Fa. Sander) mittels Hochspannung erzeugt. Eingeleitet werden sollten 67 mg O<sub>3</sub>/h. Die Maximalleistung des Generators ist etwa drei Mal so hoch, um die Blutegel in den nachfolgenden Aquarien nicht zu schädigen wurde die Leistung auf diesen Wert gedrosselt (Abbildung 8).

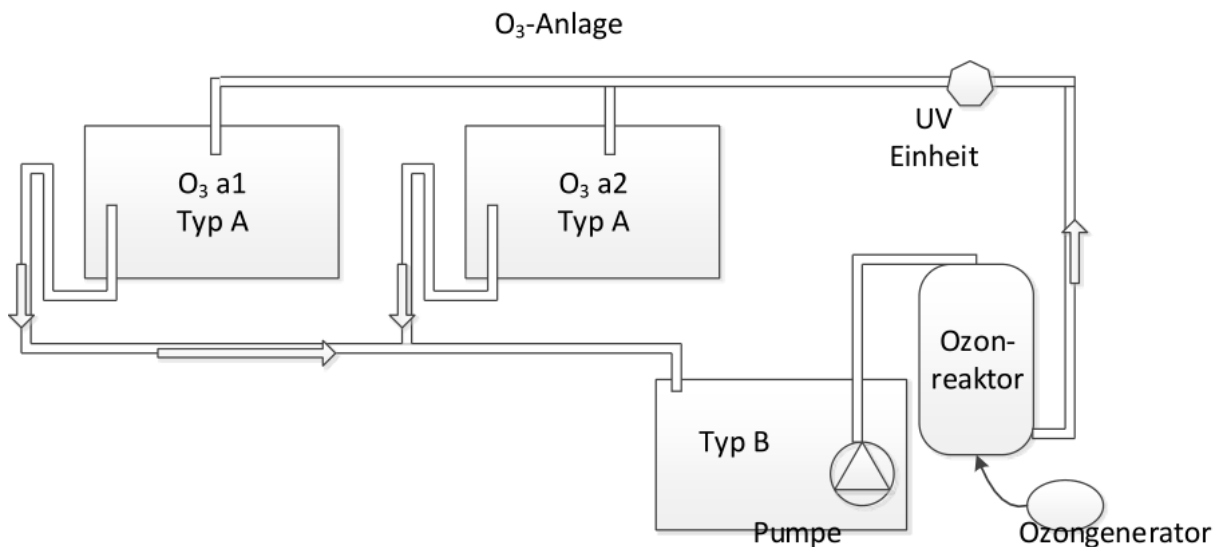


Abbildung 8: Hydraulisches Schema der O<sub>3</sub>-Anlage, Pilotversuch; O<sub>3</sub>ax; x = Aquarienummer der O<sub>3</sub>-Anlage. Pfeile bezeichnen Fließ-/Förderrichtung, Aquarienummern sind im Text beschrieben.

### 2.1.1.5 Kontroll-Anlage

Über Schläuche lief das Wasser aus den Egelaquarien in ein rahmenloses Aquarium Typ B, das mit 3,1 kg Tuffschotter bestückt war. Eine Tauchpumpe (Forza 5000, Fa. AquaForte) sorgte für die Kreislaufführung des Wassers durch Schläuche und PVC Rohre zurück in die beiden Egelaquarien (Abbildung 9).

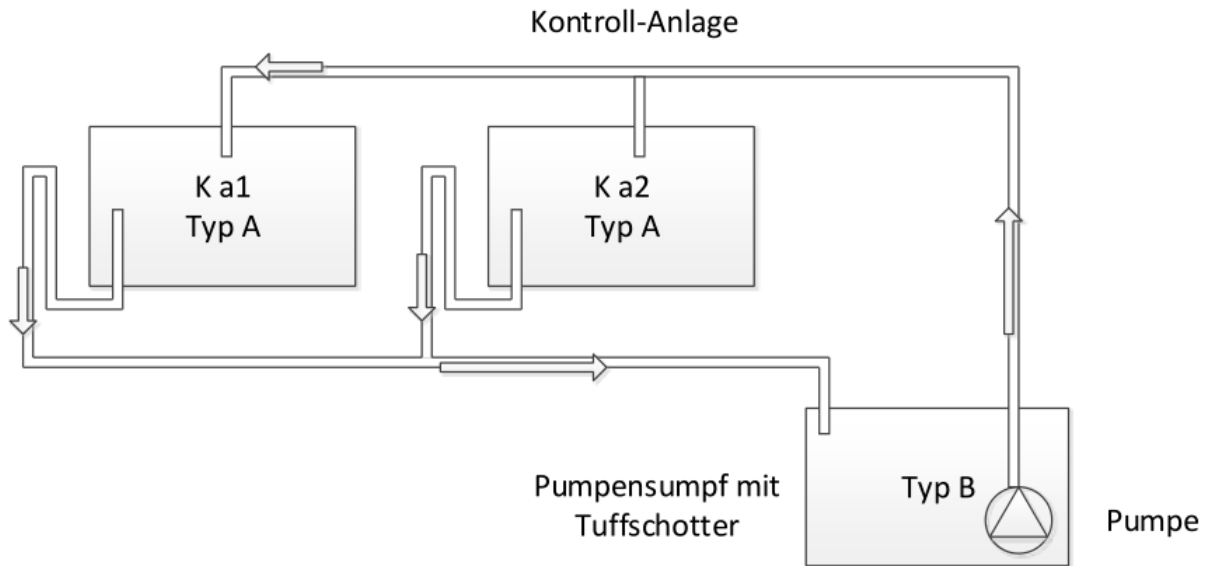


Abbildung 9: Hydraulisches Schema der Kontroll-Anlage, Pilotversuch; Kax: x = Aquarienummer der Kontroll-Anlage. Pfeile bezeichnen Fließrichtung, Aquariertypen sind im Text beschrieben.

## Regelmäßige Messungen und Wartungsarbeiten

Folgende allgemeinen Routineüberprüfungen und -arbeiten wurden sowohl im Pilotversuch als auch in den Fütterungsversuchen durchgeführt:

- Messung chemische und physikalische Wasserparameter
- Funktionskontrolle Fluchtsperre
- Optische Kontrolle Wasserzirkulation (Wasserzulauf i. d. Aquarien)
- Verschmutzung u. Reinigung Ablaufsicherungen
- Allgemeine Kontrolle d. Raumes (Undichtigkeiten, etc.)

In allen Anlagen bedarfsgemäß durchgeführte Messungen und Beprobungen:

- Temperatur
- Ammonium
- Nitrit
- Nitrat
- Ammoniak  $\text{NH}_3$
- TOC
- CSB
- pH
- Wasserprobe für mikrobiologische Untersuchung

Anlagenspezifisch fanden folgende Kontrollen und Arbeiten statt:

EE-Anlage:

- Täglich:
- pH-Wert

Bio-Anlage:

- Täglich:
- Funktion UV-Einheit

HF/UV-Anlage:

- Täglich:
- Temperaturkontrolle
- Reaktorfunktion

O<sub>3</sub>-Anlage:

- Täglich:
- Volumenstrom O<sub>3</sub>
- Funktion UV-Einheit

Kontroll-Anlage:

In der Kontroll-Anlage wurden keine anlagenspezifischen Wartungsarbeiten durchgeführt.

### 2.1.2 Messung physikalischer und chemischer Parameter

Ammonium, Nitrit und Nitrat wurden photometrisch über die Küvettentests und ein Photometer XION 500 (Fa. Hach Lange) gemessen. Photometrische Messungen basieren darauf, dass Farbe und Absorption von Licht, das durch das zu analysierende Medium (hier Wasser) geleitet wurde, von der stofflichen Zusammensetzung und der Konzentration der Inhaltsstoffe abhängt. Die eingesetzten Küvetten tragen eine identifizierende Markierung (Barcode), worauf sich das Photometer selbständig so einstellt, dass der passende Messbereich gewählt wird. Aus der Wellenlänge des austretenden Lichts wird die gefragte Konzentration vom Photometer errechnet und auf dem Display ausgegeben. Die eingesetzten Küvetten mit den jeweiligen Messbereichen zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Verwendete Küvettentests Pilotversuch, alle Messungen erfolgten nach Anweisung des Herstellers im Testkit (Lange 2012).

Parameter	Küvettentest	Messbereich (mg/l)	Methode
Ammonium	LCK 304	0,02 - 2,50	Indophenolblau
Ammoniumstickstoff	LCK 304	0,015 - 2,000	Indophenolblau
Nitrat	LCK 339	1,0 - 60,0	2,6-Dimethylphenol
Nitratstickstoff	LCK 339	0,23 - 13,50	2,6-Dimethylphenol
Nitrit	LCK 541	0,005 - 0,100	Diazotierung
Nitrit	LCK 341	0,05 - 2,0	Diazotierung
Nitritstickstoff	LCK 541	0,0015 - 0,0300	Diazotierung
Nitritstickstoff	LCK 341	0,015 - 0,6	Diazotierung

### **Ammoniumbestimmung**

Ammoniumionen reagieren bei einem pH-Wert von 12,6 mit Hypochloritionen und Salicylaten zu Indophenolblau. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Gegenwart von Nitroprussid-Natrium. Die Messung erfolgt photometrisch (Lange 2012).

### **Nitritbestimmung**

Die Nitrite in der Wasserprobe reagieren mit primären, aromatischen Aminen (in der Küvette in Form von Sulfanilsäure) zu Diazoniumsalzen. Diese Salze wiederum bilden mit aromatischen Verbindungen Azofarbstoffe. In dem Küvettentest LCK 341 ist die Verbindung 1-Naphthylaminsulfonsäuresalz im DosiCap®Zip beigegeben. Nach einer festgelegten Reaktionszeit erfolgt die Bestimmung der Nitritkonzentration photometrisch (Lange 2012).

Die drei genannten Parameter wurden während des Versuchszeitraums wöchentlich gemessen. In den kritischen Phasen, beim Einfahren der Anlage und in der ersten Woche nach der Fütterung, wurden zusätzliche Messungen durchgeführt, da hier höhere Schwankungen erwartet wurden, die ggf. ein Eingreifen (Teilwasserwechsel) notwendig machten. Bei ungewöhnlichen und unerwarteten Messergebnissen wurden Kontrollmessungen durchgeführt.

### **Nitratbestimmung**

In der Analyseküvette für Nitrat befinden sich 60%ige Schwefelsäure und 33%ige Phosphorsäure, welche zusammen mit der Wasserprobe (1ml) eine schwefel- und phosphorsaure Lösung bilden. Die Nitrationen in der Probe reagieren mit dem zuzugebenden 2,6-Dimethylphenol zu 4-Nitro-2,6-dimethylphenol. Dieser Farbkomplex wird nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten bei einer Wellenlänge von 370 nm optisch vermessen (Lange 2012).

### **pH-Wert und Temperatur**

Für die pH- und Temperaturmessungen wurde das Kombigerät pH 320 von WTW, Weilheim verwendet. Den pH-Wert misst das Gerät elektrochemisch mit einer Einstab-Glaselektrode, die Temperatur mittels eines thermischen Messwiderstands. Die Anzeigen erfolgen digital. Die Kontrolle von pH-Wert und Temperatur erfolgte dreimal wöchentlich.

### 2.1.3 Messung der mikrobiologischen Wasserparameter

Für die erste Analyse wurde Wasser aus dem vorbereiteten Mischwasser (2.1.1) entnommen. Die Probenahmen für die Folgeuntersuchungen erfolgten mittels steriler Glaspipetten aus der Mitte des Wasserkörpers. Die Probe wurde in autoklavierte, sterile Glasröhrchen gefüllt, sofort auf 4°C gekühlt und nach Gießen in das IAM (Institut für angewandte Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen) zur Untersuchung transportiert. Es wurden jeweils 10 ml Wasser entnommen. Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden diagnostische Standardmedien nach Herstelleranweisung verwendet: R2A-Agar der Firma Carl Roth, Karlsruhe, sowie EMB-Agar von Merck, Darmstadt. Die mikrobiologischen Untersuchungen der Aquarienwasserproben umfasste die Untersuchung der Konzentration und Diversität auf DEV, R2A und EMB kultivierbarer Bakterien (Bestimmung Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe). DEV ist ein Standardmedium, das nach Deutschem Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung (DEV) verwendet wird (DIN 38 411). Es setzt sich folgendermaßen zusammen: 10 g Fleischextrakt, 10 g Pepton, 0,5 g NaCl und 15 g Agar pro Liter Medium. R2A ist ebenfalls ein für die Detektion von wasserassoziierten Bakterien entwickeltes, relativ „nährstoffarmes“ Komplexmedium. Es eignet sich zur Kultivierung oligotropher Bakterien<sup>1</sup>. Bei EMB handelt sich um ein spezielles Medium für die Detektion von *Enterobacteriaceae*, welche mit Hilfe einer spezifischen Färbung detektiert werden. Je Wasserprobe wurde eine Verdünnungsreihe von 10<sup>0</sup> bis 10<sup>-4</sup> in autoklavierter 0,9 Gew. % Natriumchlorid-Lösung angelegt und jede Verdünnungsstufe in Triplikaten (je 100 µl) auf DEV (DEV Nutrient agar, MERCK), R2A (R2A-agar, Oxoid) und EMB (Eosin Methylene Blue Agar, MERCK) Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für fünf Tage dunkel bei 25°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Bakterienkolonien gezählt und Anzahl und Abundanz verschiedener Koloniemorphologietypen dokumentiert.

Die Auszählung der gewachsenen Kolonien erfolgte am zweiten und siebenten Tag nach der Probenahme. Die Zählung am zweiten Tag diente zur Kontrolle des Wachstums der Mikroorganismen, um nötigenfalls eine zeitnahe Wiederholungsmessung vornehmen zu können, die Zählung am siebten Tag war die maßgebliche Zählung. Ausgezählt wurden die bebrüteten Platten von Hand. Die Ergebnisse wurden mit folgender Gleichung zu der Anzahl von Koloniebildend Einheiten (KBE) bezogen auf 1 ml Wasser umgerechnet:

---

<sup>1</sup> Oligotrophe Bakterien sind an niedrigere Nährstoffkonzentrationen angepasst.

$$KBE = N_{KBE} \times \frac{\text{Verdünnung}}{V_{Probe}}$$

$N_{KBE}$ :	Anzahl der Kolonien
$V_{Probe}$ :	Volumen der Probe (ml)
KBE:	Koloniebildende Einheiten (1/ml)

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl im Aquarienwasser vorliegender Bakterien wurden absolute Zellzahlen/ml Wasserproben (ZZ/ml Wasser) erfasst. Dazu wurde die Anzahl der bakteriellen Zellen nach Filtration fixierter Wasserproben auf 0,22 µm Membranfilter mittels SybrGreen I<sup>2</sup>-Färbung (Sigma) (DNA-bindender Farbstoff) behandelt. Es wurden jeweils 9,6 ml Wasserproben mit 0,4 ml 50% Glutardialdehyd (GDA) fixiert (final 2% GDA) und bei 4°C gelagert. Je 1 bis 2 ml der fixierten Proben wurden auf schwarze Membranfilter (0,22µm Porengröße; Whatman) filtriert und die Zellen mit SybrGreen I nach (Lunau et.al. 2005) gefärbt und epifluoreszenz-mikroskopisch gezählt.

Bei beiden Analysen (Konzentration kultivierbarer Bakterien und Gesamtzellzahlen) wurden Mittelwerte je Anlagensystem über die parallel geschalteten Aquarien pro Anlagensystem berechnet. Hierbei wurden Standardabweichungen durch Fehlerfortpflanzung unter Einbezug der Standardabweichungen der Plattierungsreplikate (drei Replikate je Verdünnungsstufe) bzw. Zählreplikate (10 Zählfelder) der Einzelaquarienbeprobungen ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte in SigmaPlot 12 (Systat Software ink.) zur Erfassung signifikanter Unterschiede zwischen verschiedenen Anlagen bzw. zwischen verschiedenen Zeitpunkten einer Anlage mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unter Verwendung des TukeyTest.

Die Auswertung der Ergebnisse beschränkte sich auf die Bestimmung der Konzentration kultivierbarer Bakterien (KBE), einzelne Mikroorganismen wurden nicht identifiziert.

## **2.2 Haupt-Versuchsanlage für Fütterungsversuche**

### **2.2.1 Aufbau der verbesserten Versuchsanlage**

Aufbauend auf den Erkenntnissen der Pilotanlage (3.1.6) wurde eine verbesserte Versuchsanlage errichtet. Drei Wasserbehandlungstechniken wurden aufgebaut:

---

<sup>2</sup> SybrGreen I: DNA bindender Farbstoff, der in Bakterienzellen eindringt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie können die Bakterienzellen durch „Grün-Fluoreszenz“ visuell dargestellt werden.

- EE-Anlage: Ansäuerung mittels Eichenextrakt
- RO-Anlage: Ansäuerung von Umkehrosmosewasser mittels CO<sub>2</sub>
- SB-Anlage: Filterung über Schwimmsandfilter

In einem dafür eingerichteten Raum wurden 9 identische Aquarien in einem Regalsystem aufgebaut. Jeweils drei Aquarien wurden hydraulisch verbunden (Triplikate) und bildeten mit den folgenden Komponenten ein Gesamtsystem:

- Drei Aquarien
- Pumpensumpf
- Tauchpumpe in Pumpensumpf
- Niveausteuerung in Pumpensumpf
- Biofilter mit integriertem UV-Strahler (Kanisterfilter, Druckfilter)
- Puffertank
- Tauchpumpe in Puffertank
- Rohrleitungssystem
- Durchlaufkühler
- Anlagenspezifische Komponenten

Die Aquarien wurden in zwei Reihen übereinander in einem Regal aus verzinkten Stahlprofilen eingebaut (Abbildung 10). Die Temperaturhaltung erfolgte über die Raumtemperatur (Heizkörper an Zentralheizung), mithilfe eines mechanischen Thermostats, eine vertikale Luftumwälzung verhinderte eine Temperaturschichtung. Alle genannten Komponenten befanden sich im selben Raum mit Ausnahme der Durchlaufkühler, die im Nebenraum untergebracht waren.

Die rahmenlos geklebten Aquarien Typ C (Eigenbau) hatten die Abmessungen: L/B/H 1.200/400/500 mm, Glasstärke 8 mm. In die Aquarien wurde im Abstand von 180 mm parallel zu einer Stirnseite ein Edelstahlsieb eingeklebt. Durch dieses Sieb konnte das Wasser strömen, die Blutegel konnten es nicht passieren. Die Siebweite betrug 0,1 mm. Die Aquarien waren so in zwei Abteile geteilt. Das größere Abteil (L/B 1.020/400 mm) wurde mit den Blutegeln besetzt, im kleineren Abteil (L/B 180/400 mm) befand sich der Überlauf. Das größere Abteil war mit einer elektrischen Fluchtsperre versehen, die die Blutegel am Verlassen des Aquariums hinderte. Verschmutzte das Sieb, konnte der Wasserspiegel in dem egelbesetzten Abteil ansteigen und wieder überströmen. Ein Niveauunterschied zwischen den beiden Abteilen war ein Indikator für ein verschmutztes Sieb, welches sich mit einer Bürste leicht reinigen ließ. Die verstopfenden abgestreiften Häute der Blutegel und andere Verunreinigungen wurden bedarfsgerecht abgesaugt. Das Wasserniveau wurde mittels eines Überlaufs im egelfreien Abteil auf 200 mm eingestellt. Über den Überlauf lief das zirkulierende Wasser in HT Rohre DN 40, die in einen Pumpensumpf im freien Auslauf entwässerten. Je drei Aquarien waren an einen Pumpensumpf angeschlossen. Dieser bestand aus einer PP Kunststoffwanne (Fa. Auer, L/B/H 80/60/30 cm, Nutzvolumen rd. 100 Liter). Ein zweiter Überlauf im egelfreien Abteil diente als

Notüberlauf für den Fall einer Verstopfung im regulären Überlauf, der an das Kanalsystem angeschlossen war. Im Pumpensumpf war eine Tauchpumpe (AquaForte 8500) installiert, die über eine Niveausteuerng (Level Controller, Fa. B+B Sensors) angesteuert wurde. Diese Pumpe förderte mit 8,5 m<sup>3</sup>/Std mehr als die Pumpe, die für die ständige Wasserzirkulation sorgte (AquaForte 3500, 3,5 m<sup>3</sup>/Std, installiert im Puffertank). Über die Niveausteuerng wurde sie daher immer nur kurzzeitig angesteuert, so dass ein Überlaufen der Pumpensümpfe nicht möglich war, so lange die technischen Einrichtungen funktionierten. Die Pumpe im Pumpensumpf förderte über Schläuche und PVC HI Rohre DN 25 das übergelaufene Wasser durch einen geschlossenen Kanister-Biofilter (Oase FiltoClear) in einen Puffertank. Hierbei handelte es sich um einen Trinkwassertank (Firma Rotex, System Variocistern) aus HDPE mit einem Nutzvolumen von 1.000 Litern. In diesen Puffer war seitlich ein Messingstutzen, 1“, eingebaut, der als Überlauf diente und das Nutzvolumen auf 650 Liter begrenzte. Der Wasserzulauf in den Aquarien wurde für alle Aquarien auf 600 l/h/Aquarium eingestellt. In allen Anlagen wurde bei den Fütterungsversuchen Wasser aus der öffentlichen Trinkwasserleitung der Gemeinde Biebertal verwendet. Auch das Rohwasser, das mittels der Umkehrosroseanlage aufbereitet wurde, kam aus der Trinkwasserleitung.

Einschließlich der Aquarien, Filter, Rohrleitungen, Pumpensumpf und Puffertank stand somit ein Gesamtvolumen von 1.100 Litern je System zur Verfügung. Durch Verdunstung verringerte sich dieses wöchentlich um ca. 40 Liter, welche im Zusammenhang mit dem wöchentlichen Teilwasserwechsel ersetzt wurden. Wöchentlich wurden je Anlage 200 Liter Wasser in den Puffertank eingespeist und die dadurch überlaufende Wassermenge abgeleitet. Eine tief liegende, beruhigte Einleitung, kombiniert mit einer niedrigeren Temperatur des frischen Wassers sorgte dafür, dass das eingeleitete Wasser nicht unmittelbar wieder abfloss.



Abbildung 10: Teilansicht der Haupt-Versuchsanlage für Fütterungsversuche 1 bis 3; graue Kunststoffkästen unten sind Pumpensümpfe.

Es wurden zwei unterschiedliche Techniken der Ansäuerung des Haltungswassers untersucht, um eine Aussage treffen zu können hinsichtlich der Bedeutung eines niedrigen pH-Wertes für die Gesundheit der Bluteigel, da der Pilotversuch Hinweise auf eine positive Wirkung gegeben hatte. Daher wurde neben der Ansäuerung mittels Eichenextraktzugabe, bei der enthaltene weitere Inhaltsstoffe (Huminstoffe, etc.) einen Effekt haben könnten, die CO<sub>2</sub>-Einsprudlung in entmineralisiertes RO-Wasser (RO: Reverse Osmosis, Umkehrosiose) gewählt. Die Ansäuerung wurde kombiniert mit einer biologischen Filterung in Kompaktfiltren (Kanisterfilter), wie sie in Gartenteichen eingesetzt werden. Aufwuchsfläche für die Bakterien waren hier Schaumstoffe mit unterschiedlicher Porosität, die sowohl Nitrifikanten als auch Denitrifikanten Lebensraum bieten sollen. Da Schwimmsandfilter in der Aquakultur eingesetzt werden, weil sie eine hohe Filterleistung bei den N-Produkten Ammonium und Nitrit besitzen, wurden sie in den Versuch einbezogen. Diese Filter bieten eine sehr gute Sauerstoffversorgung der auf dem Sand als Substrat angesiedelten Mikroorganismen. Anaerobe Zonen sind in diesen Filtern nicht vorhanden, so dass hier nicht mit einem Nitratabbau zu rechnen war.

Um einer zu starken Wassererwärmung in der Anlage vorzubeugen, wurde das zirkulierende Wasser der drei Anlagen durch je einen elektrischen Wasserkühler (HC 500, Hailea, Guangdong, China) geleitet, der die Wassertemperatur auf 21°C begrenzte.

In allen Anlagen wurde bei den Fütterungsversuchen Wasser aus der öffentlichen Trinkwasserleitung der Gemeinde Biebertal verwendet. Auch das Rohwasser, das mittels der Umkehrosmose-Anlage aufbereitet wurde, kam aus der Trinkwasserleitung.

Die Fütterung erfolgte in der gleichen Weise wie im Pilotversuch (2.1.1). Verstorbene Blutegel wurden täglich aus den Aquarien entfernt. Zum Versuchsende wurden die Blutegel gezählt und gewogen.

### 2.2.1.1 EE-Anlage

In der EE-Anlage sollte das Wasser mittels Zudosierung von Eichenextrakt auf einen pH von ca. 6,7 abgesenkt werden. Bei anfänglichen Versuchen, die Dosierung mithilfe eines medizinischen Infusionsbestecks und manueller Regelung zu realisieren, konnte der pH-Wert stabil gehalten werden. Das Infusionsbesteck erwies sich als ungeeignet, sowie die Blutegel eingesetzt waren. Daraufhin wurde eine automatische Dosierstation installiert. Als Dosierpumpe wurde die Membranmagnetdosierpumpe LMI P573-352N3 der Firma Milton Roy verwendet. Gesteuert wurde die Dosierpumpe von einem Regelgerät Typ PRW 12, F1K1 der Firma Medotec. Eine pH-Elektrode meldete kontinuierlich den gemessenen pH-Wert an das Regelgerät, das bei Überschreitung des Sollwertes die Dosierpumpe ansteuerte, die aus einem 5 Liter Kanister Eichenextrakt (Eichen Zac, Fa. Zoo Zajac, Essen) ansaugte und dosiert in den Puffertank eintropfte. Eine Mischpumpe, die im Puffertank hing (Aquarius 1800, Fa. Oase) sorgte durch ständige Wasserbewegung innerhalb des Puffers für eine gute Vermischung des Eichenextrakts mit dem Pufferwasser und so für einen konstanten pH-Wert im zirkulierenden Anlagenwasser im Bereich 6,5 bis 6,9. Als Biofilter wurde der FiltoClear 30.000, Fa. Oase, eingesetzt (Abbildung 11).

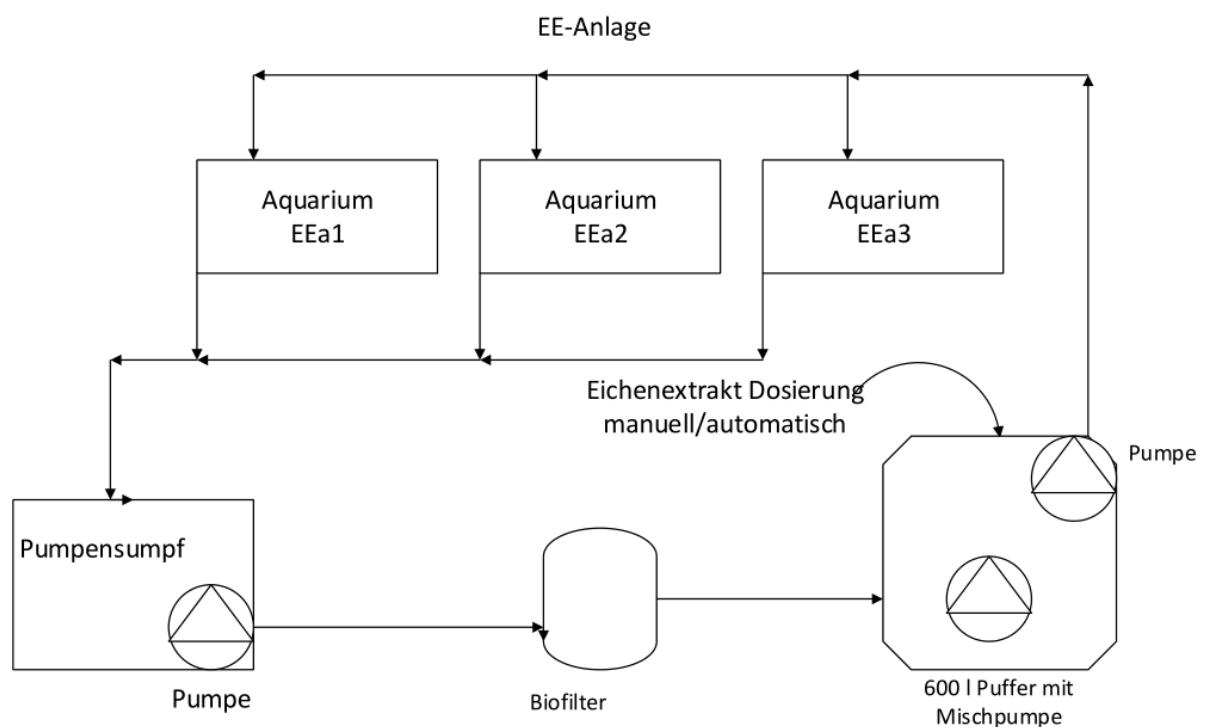


Abbildung 11: Hydraulisches Schema der EE-Anlage, Fütterungsversuche 1-3;

EEax: x = Aquarienummer EE-Anlage; Pfeile geben Fließ- bzw. Förderrichtung an.

### 2.2.1.2 RO-Anlage

Umkehrosmoseanlagen drücken mittels mechanischen Drucks Rohwasser (hier: Leitungswasser) durch eine Membrane. Die Poren der Membrane sind so klein, dass Partikel größer  $0,0001\mu\text{m}$  zurück gehalten werden. Somit werden unter anderem auch die Härtebildner, also Calcium- und Magnesiumionen, zurück gehalten und abgeschlagen. Der mechanische Druck muss dazu höher sein als der osmotische Druck des Rohwassers, der bei Leitungswasser üblicherweise bei 2 bar liegt. Da der Leitungswasserdruck in Biebertal bei über 6 bar liegt, kam die eingesetzte Anlage (Typ PRF-RO, Pentair, USA) ohne Pumpe aus. Aus einem Liter Leitungswasser mit einem pH von 7,55 gewinnt die Anlage rd. 200 ml Wasser mit einem pH von 6,5. Da die Blutegel mit ihren Ausscheidungen den pH-Wert sehr schnell wieder bis über 8,5 anheben, wurde zusätzlich  $\text{CO}_2$  eingesprudelt und gelöst. Die automatische Steuerung der  $\text{CO}_2$ -Einblasung übernahm ein pH-Controller Typ Evolution de Luxe der Firma Dennerle, Vinningen. Die Steuereinheit öffnete bzw. schloss ein elektrisch betätigtes Magnetventil, das hinter einem Druckminderer an einer  $\text{CO}_2$  Flasche angebaut wurde. Bei dem  $\text{CO}_2$  handelte es sich um Industriegas UN 1013, ISO 14175-C1-C von Air Liquide, das in einer Hochdruckstahlflasche zur Verfügung stand. Ein Druckminderer reduzierte den Primärdruck (rd. 100 bar, abfallend) auf 1 bar, das an die Regelung angeschlossene elektrisch betätigte Magnetventil öffnete bei Bedarf und leitete  $\text{CO}_2$  in den Reaktor gasförmig ein. Eine pH-Sonde im Puffertank maß ständig den pH-Wert im Puffer. Das Gas wurde durch einen Schlauch mit Rückschlageinrichtung in einen  $\text{CO}_2$  Reaktor (Fütterungsversuch 1: Pro Flora Taifun, Fa. JBL, Neuhofen; 25 Segmente, ca. 40cm Höhe; Fütterungsversuche 2 + 3: Reaktor S, Fa. Dupla) unten eingeblasen. Eine schraubenförmig aufsteigende Innenbahn in dem Reaktor führte die Gasblasen so lange im Wasser, bis sich die  $\text{CO}_2$  Bläschen im Wasser aufgelöst hatten. Der pH-Wert in der Anlage konnte damit zwischen pH 6,5 und 6,9 gehalten werden. Das RO-Wasser wurde mittels Meersalz (Preis Meersalz, Fa. Preis, Bayerfeld) mit  $0,75\text{g/l}$  konditioniert. Als Biofilter wurde der FiltoClear 30.000 eingesetzt (Abbildung 12).

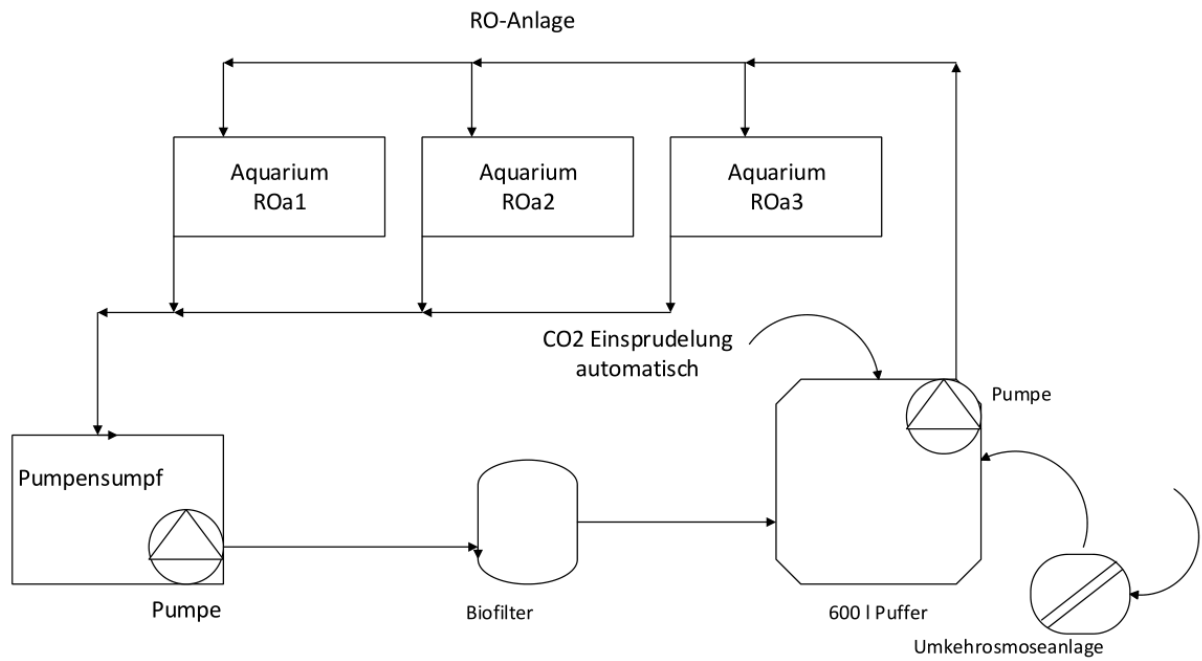


Abbildung 12: Hydraulisches Schema der RO-Anlage, Fütterungsversuche 1-3;

ROax: x = Aquarienummer in der RO-Anlage; Pfeile bezeichnen Fließ- bzw. Förderrichtung.

### 2.2.1.3 SB-Anlage

In einem Schwimmsandfilter/Schwimmbettfilter (SB) wurde Sand einer definierten Sieblinie mittels aufwärts gerichteter Strömung im Wasser in der Schwebe gehalten. Der Filter bestand aus einem Kanalgrundrohr (KG) aus PVC, DN 150, mit geschlossenem Boden, oben war das Rohr offen. Zentrisch wurde in diesem Rohr ein zweites Rohr, PVC HI DN 25, nach unten geführt und mündete in einem Trichter, der sich nach unten aufweitete. Der Maximaldurchmesser des Trichters war 20 mm kleiner als der Innendurchmesser des KG Rohres, so dass zwischen KG Rohr und Trichter ein Ringspalt von 10 mm entstand. Der Trichter wurde mittels Abstandshaltern 10 mm oberhalb des geschlossenen Bodens des KG Rohres gehalten. In den Zwischenraum zwischen den Rohren wurden 25 kg Quarzsand (Sorte RQ24, Körnung 0,355-0,8 mm, feuergetrocknet, Raunheimer Quarzsand) eingefüllt. Eine Tauchpumpe (AquaForte 8500) im Pufferspeicher förderte Wasser durch einen Schlauch und das zentrale HI-Rohr, so dass es mit hoher Strömungsgeschwindigkeit durch den Ringspalt austrat. Hierdurch wurde der Sand im Wasser bis zu einer Höhe von etwa 1.250 mm in der Schwebe gehalten. Über einen Kugelhahn in dem Schlauch ließ sich das geförderte Wasservolumen und somit die Höhe des Sand-Wassergemischs regulieren. Oberhalb der Sandgrenze befand sich gefiltertes Wasser, das über einen seitlichen Überlauf und ein HT-Rohr (beides DN 50) im freien Auslauf zurück in den Puffer lief. Die Pumpe, die den Schwimmsandfilter beaufschlagte, lief ständig. Sessilen Bakterien diente der Sand als Aufwuchsfläche. Ein Biofilter FiltoClear 12.000 (Fa. Oase) filterte Feinstoffe aus, die ansonsten in den Schwimmsandfilter gepumpt worden wären (Abbildung 13).

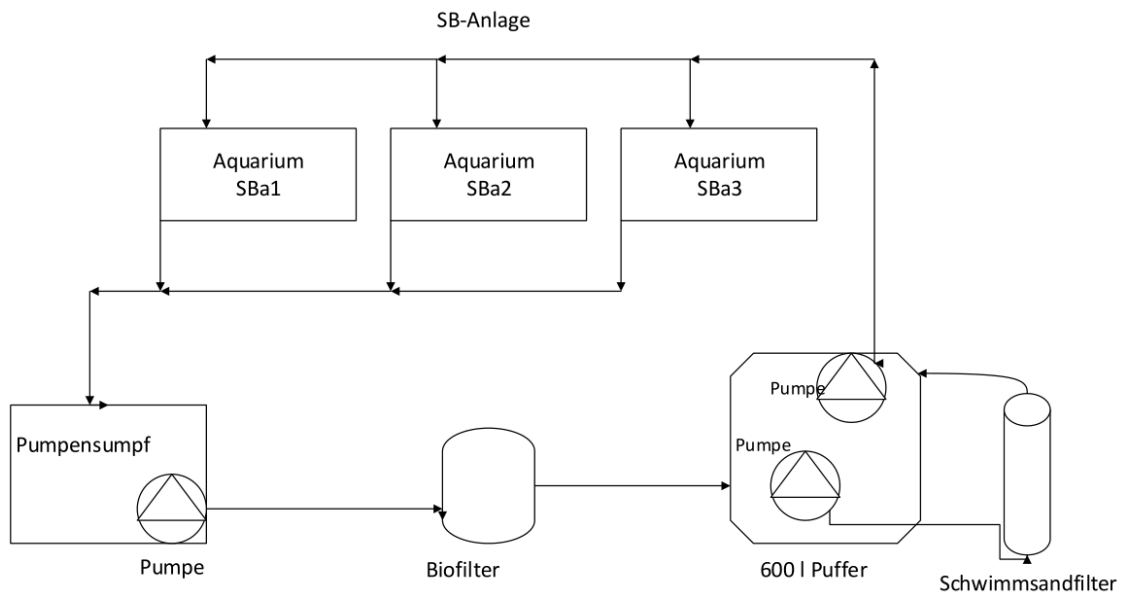


Abbildung 13: Hydraulisches Schema der SB-Anlage Fütterungsversuche 1 bis 3;  
SBax: x = Aquarienummer SB-Anlage; Pfeile zeigen Fließrichtung an.

## Regelmäßige Wartungsarbeiten

Folgende allgemeinen Routineüberprüfungen und -arbeiten wurden durchgeführt:

- Messung chemische und physikalische Wasserparameter
- Funktionskontrolle Fluchtsperre
- Optische Kontrolle Wasserzirkulation (Wasserzulauf i. d. Aquarien)
- Durchflussmenge zirkulierendes Wasser
- Funktionskontrolle Niveauregulierung Pumpensumpf
- Verschmutzung u. Reinigung Edelstahl-Trennsiebe
- Funktionskontrolle UV-Lampen in Biofiltern
- Allgemeine Kontrolle d. Raumes (Undichtigkeiten, etc.)
- pH-Wert

Anlagenspezifisch fanden zusätzlich folgende Kontrollen und Arbeiten statt:

EE-Anlage:

- Täglich:
- Vorrat Eichenextrakt
- Funktionskontrolle Dosierstation Eichenextrakt
- Positionierung pH-Sonde
- Wöchentlich:
- Teilwasserwechsel

RO-Anlage:

- Täglich:
- Prüfung Primärdruck CO<sub>2</sub>-Flasche
- Prüfung CO<sub>2</sub>-Einblasung
- Positionierung pH-Sonde
- pH-Anzeige an Kontrollgerät
- Wöchentlich:
- Teilwasserwechsel

SB-Anlage:

- Täglich:
- Funktionskontrolle Schwimmsandfilter
- Wöchentlich:
- Teilwasserwechsel

### 2.2.2 Messung chemischer und physikalischer Parameter

Die Bestimmung von Ammonium, Nitrit und Nitrat erfolgte photometrisch über Küvettentests und ein Photometer PF-12 der Fa. Macherey-Nagel, ein Einstrahl-Filterphotometer mit Mikroprozessorsteuerung, Selbsttest und Autokalibrierung. Die eingesetzten Küvetten (Visocolor ECO und Nanocolor, beide Fa. Macherey-Nagel, Düren) mit den jeweiligen Messbereichen sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Die jeweilige Messmethode wird an dem Photometer manuell eingegeben, Messung erfolgte nach Herstellerprotokollen. Geheizt wurden die Küvetten (CSB) in einem Thermoblock Nanocolor Vario C2 von Macherey-Nagel.

Tabelle 7: Verwendete Küvettentests Fütterungsversuche 1 bis 3, (Macherey, 2014); die Diazotierung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers im Testkit.

Parameter	Küvettentest	Messbereich (mg/l)	Methode
<b>Visocolor ECO</b>			
Ammonium	Ammonium 3	0,2 – 3,0	DIN 38406-E5
Nitrat	Nitrat	1,0 – 120,0	Diazotierung
Nitrit	Nitrit	0,02 – 0,5	Diazotierung
Chlor	Chlor 6	0,05 – 6,0	DIN ISO 7393 G4-2
<b>Nanocolor</b>			
CSB	CSB 40	2 – 40	ISO 15705:2002
TOC	TOC 25	2 – 25	DIN EN 1484

#### Temperatur- und pH-Messung

Die Temperatur wurde mit einem Referenzthermometer GTH 175/Pt-K von Greisinger electronic, Regenstauf, gemessen. Das Gerät verwendet einen abgesetzten, kabelgebundenen Pt 1000 Sensor in einer Messspitze, die Anzeige erfolgt digital. Für die pH-Bestimmung wurde das Kombigerät pH/°C pHep4 von Hanna Instruments, Vöhringen, verwendet. Der pH-Wert wird elektrochemisch mit einer Einstab-Glaselektrode gemessen. Die Anzeige erfolgt digital. Die Messung von pH-Wert und Temperatur erfolgte dreimal wöchentlich jeweils montags, mittwochs und freitags.

### **Ammoniumbestimmung**

DEV-Verfahren: Aus Ammonium-Ionen entsteht durch Chloreinwirkung im alkalischen Bereich Monochloramin. Dieses bildet mit Phenolen in Anwesenheit eines Katalysators blaue Indophenolfarbstoffe (Reaktionsgrundlage analog zu DIN 38406-E5), (Macherey, 2014).

### **Nitratbestimmung**

Nitrat wird mit einem anorganischen Reduktionsmittel zu Nitrit reduziert. Mit dem Nitrit wird ein aromatisches Amin diazotiert, welches anschließend zu einem Azofarbstoff gekoppelt wird (Macherey, 2014).

### **Nitritbestimmung**

Sulfanilsäure oder Sulfanilamid werden in saurer Lösung von Nitrit diazotiert. Das Diazoniumsalz wird anschließend mit einem aromatischen Amin gekoppelt. Dabei bildet sich ein intensiv gefärbter Azofarbstoff (Macherey, 2014).

### **Bestimmung des freien Chlors**

Freies Chlor reagiert bei einem pH-Wert von 5-6 mit N,N-Diethyl-1,4-phenylendiamin (DPD) zu einem rotviolettten Farbstoff. In Gegenwart von Iodid-Ionen kann der Gesamtchlorgehalt bestimmt werden (Reaktionsgrundlage analog DIN ISO 7393 G4-2) (Macherey, 2014).

### **Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB)**

Bestimmt wurde nach DIN-Methode: Der chemische Sauerstoffbedarf eines Wassers wird durch die silberkatalysierte Oxidation mit Kaliumdichromat/Schwefelsäure in 2 Stunden bei 148°C ermittelt. Gemessen wird die Farbabnahme der gelben Dichromatlösung (Macherey 2014).

### **Bestimmung des Gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC)**

Die Bestimmung erfolgt in 2 Schritten:

1. Austreiben des anorganischen Kohlenstoffs (TIC)
2. Aufschluss des organischen Kohlenstoffs (TOC) und Nachweis des entstandenen CO<sub>2</sub> mittels eines Indikators

(Reaktionsgrundlage analog DIN EN 1484) (Macherey 2014).

### 2.2.3 Messung der mikrobiologischen Wasserparameter

Die Blutegel wurden ebenfalls mikrobiologisch untersucht. Die Ermittlung der Gesamtzellzahl und die mikrobiologischen Untersuchungen des Haltungswassers wurden wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

**Bestimmung der Gesamtzellzahl im Aquarienwasser vorliegender Bakterien.** Es wurden die absoluten Zellzahlen/ml Wasserproben (ZZ/ml Wasser) erfasst. Dies erfolgte über SybrGreen I Färbung (Sigma, DNA-bindender Farbstoff) der bakteriellen Zellen nach Filtration fixierter Wasserproben auf 0,22 µm Membranfilter. Es wurden jeweils 9,6 ml Wasserproben mit 0,4 ml 50% Glutardialdehyd (GDA) fixiert (final 2% GDA) und bei 4°C gelagert. Je 1 bis 2 ml der fixierten Proben wurden auf schwarze Membranfilter (0,22 µm Porengröße; Whatman) filtriert und die Zellen mit SybrGreen I nach Lunau et al. (2003) gefärbt und epifluoreszenzmikroskopisch gezählt.

Die mikrobiologischen Untersuchungen der Aquarienwasserproben umfasste die Untersuchung der Konzentration und Diversität auf DEV, R2A und EMB kultivierbarer Bakterien (Bestimmung von KBE/ml). R2A ist ebenfalls ein für die Detektion von wasserassoziierten Bakterien entwickeltes relativ „nährstoffarmes“ Komplexmedium. Es eignet sich zur Kultivierung oligotropher Bakterien. Bei EMB handelt es sich um ein spezielles Medium für die Detektion von *Enterobacteriaceae*. Diese können mit Hilfe einer spezifischen Färbung detektiert werden. Für die kultivierungsabhängigen Untersuchungen wurden jeweils 10 ml Aquarienwasser aus jedem Becken (10 cm unter der Wasseroberfläche) mit einer sterilen Glaspipette entnommen, in ein autoklaviertes Glasreagenzglas überführt und bei 4°C ins Labor transportiert. Je Wasserprobe wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^0$  bis  $10^{-4}$  in autoklavierter 0,9 Gew.% Natriumchlorid-Lösung angelegt und jede Verdünnungsstufe in Triplikaten (je 100 µl) auf DEV, R2A und EMB-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden für fünf Tage dunkel bei 25°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Bakterienkolonien gezählt und Anzahl und Abundanz verschiedener Koloniemorphologietypen dokumentiert. Die Konzentration kultivierbarer Bakterien je Anlagensystem wurde als Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe angegeben. Bei beiden Analysen (Konzentration kultivierbarer Bakterien; Gesamtzellzahlen) wurden Mittelwerte je Anlagensystem über die drei Aquarien berechnet. Hierbei wurden Standardabweichungen durch Fehlerfortpflanzung unter Einbezug der Standardabweichungen der Plattierungsreplikate (3 je Verdünnungsstufe) bzw. Zählreplikate (10 Zählfelder) der Einzelaquarienbeprobungen ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte in SigmaPlot 12 (Systat Software ink.) zur Erfassung signifikanter Unterschiede zwischen verschiedenen Anlagen bzw. zwischen

verschiedenen Zeitpunkten einer Anlage mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unter Verwendung des TukeyTest.

Die abundantesten kultivierten Bakterien wurden phylogenetisch identifiziert. Hierzu wurden von den beiden am höchsten bewachsenen Verdünnungsstufen die abundantesten morphologisch unterschiedlichen Kolonien ausgewählt. Die entsprechenden Bakterien wurden mittels Vereinzelungsausstrich in Reinkultur gebracht. Diese wurden anschließend phylogenetisch identifiziert. Zunächst wurde von jedem Isolat dazu ein Zelllysate erstellt um genomische DNA für die folgenden molekularbiologischen Untersuchungen zu gewinnen. Dazu wurde frisch gewachsene Biomasse von den Agarplatten entnommen, in Natriumphosphatpuffer gewaschen, pelletiert und in DNA-freiem Wasser suspendiert. Die bakterielle DNA wurde durch dreimaliges Einfrieren (-20°C) und anschließendes Aufkochen bei 100°C (1 min 30 sek, im Heizblock) aus den Bakterienzellen freigesetzt. Die Zelllysate wurden bei -20°C gelagert. Der wässrige Überstand der Zelllysate wurde als DNA-Template für PCR Amplifikationen verwendet. Alle Isolate wurden mithilfe einer genomischen Fingerprintanalyse (BOX-PCR) differenziert. Die BOX-PCR erfolgte mit dem Primer BOX1A, wie bei Glaeser et al. (2013) beschrieben. Der Primer bindet an repetitive Elemente die „stammspezifisch“ im bakteriellen Genom auftreten.

Durch die Anwendung spezifischer Amplifikationsbedingungen werden mehrere unterschiedlich lange DNA-Fragmente aus dem jeweiligen bakteriellen Genom vervielfältigt. Diese PCR Produkte wurden mittels einer nachfolgenden Agarosegelelektrophorese (Glaeser et al. 2013) der Länge nach aufgetrennt. Dabei wurden stammspezifische Fingerprintmuster generiert. Die Fingerprintmuster wurden mit der Analysesoftware GelCompar II (Applied Maths) vergleichend untersucht. Da davon ausgegangen werden kann, dass Isolate mit identischen BOX-Fingerprintmustern den gleichen Stamm repräsentieren, sind diese Isolate auch in der 16S rRNA Gensequenz identisch. Pro Fingerprinttyp wurde daher ein repräsentatives Isolat mittels 16S rRNA Gensequenzierung phylogenetisch identifiziert. Hierzu wurde das 16S rRNA Gen mit allgemeinen bakteriellen 16S rRNA Gen-bindenden Primern (8F und 1492R; (Lane 1991) amplifiziert und anschließend mit dem Primer 27F mit der Sanger Sequenzierungsmethode bei der Firma LGC Genomics (Berlin) sequenziert.

Nach manueller Korrektur der Sequenzen wurden die Isolate über BLAST-Analyse<sup>3</sup> der 16S rRNA Gensequenzen in der EzTaxon 16S rRNA Gen Typstamm Datenbank (EzTaxon) identifiziert. Die Identifizierung beruht auf der Erfassung der 16S rRNA Gensequenzähnlichkeiten zu dem nächstähnlichen Typstamm (Glaeser et al. 2013; Kim et al. 2012).

Die mikrobiologische Untersuchungen der Blutegel umfassten vier Egelprobenahmen (s. 3.1.7.1; 3.1.8.2). Für die Proben wurden aus jedem Versuchsbecken jeweils drei Blutegel entnommen und lebend ins IAM transportiert. Alle Tiere wurden direkt nach dem Eingang im IAM jeweils fünf min mit Leitungswasser gespült und anschließend in autoklaviertem Reinstwasser gewaschen. Bis zum 19.02.2014 (Fütterungsversuch 1) wurden die Tiere bei -20°C vor der Präparation betäubt, ab März 2014 (Fütterungsversuch 3) wurden sie mit Mineralwasser betäubt und anschließend präpariert. Bei der Präparation wurde die vordere Hälfte des Blutegels in 3 Stücke geschnitten, da eine Präparation des Darms von frisch gefütterten Blutegeln sich als nicht umsetzbar herausstellte. Diese Stücke wurden von allen drei Tieren eines Beckens mit den herauslaufenden Magen- und Darminhalt in sterile Whirl-Pak Tüten (Nasco) gefüllt und anschließend zweimal für 120 s bei höchster Geschwindigkeit in einem Stomacher (Seward) homogenisiert.

Für die kultivierungsabhängigen Untersuchungen erfolgte die Einwaage (je 0,5 g) von Blutegelgewebe und Blut-Homogenisaten in sterilen Reagenzgläsern. Die Homogenisate wurden in 4,5 ml autoklavierter 0,9 Gew.% NaCl-Lösung suspendiert ( $10^{-1}$  Verdünnung) und in 0,9 Gew.% NaCl Lösung seriell bis  $10^{-6}$  verdünnt. Ausplattiert wurden je Verdünnungsstufe 100 µl einfach auf R2A und Blutagar. Aufgrund der Höhe der zu erwartenden KBE-Zahlen wurden nur die Verdünnungsstufen  $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$  ausplattiert.

---

<sup>3</sup> Die BLAST-Analyse ermöglicht die Erfassung der 16S rRNA Gensequenzidentitäten zu den nächstähnlichen Typstämmen. Da die Sequenzähnlichkeiten, bis auf wenige Ausnahmen, mindestens >98.5%, meist >99%, waren, ist die Zuordnung auf Gattungsebene relativ genau (anhängig von der Gattung kann es Unterschiede geben). Die Zuordnung zu einer bestimmten Art ist über die 16S rRNA Sequenzanalyse, v.a. bei der partiellen Sequenzanalyse (1000 von 1500 nt), problematisch.

#### **2.2.4 Bewertung der Effektivität der Wasserbehandlung anhand der Bluteigel**

In den Fütterungsversuchen 1 und 3 wurden die Sterberaten, der Gesundheitszustand und das Gewicht der Bluteigel ermittelt. Täglich wurden verstorbene Bluteigel aus den Aquarien entnommen und dokumentiert. Aus diesen Daten wurde anschließend die Sterberate der Tiere im Zusammenhang mit der Blutfütterung berechnet und auf signifikante Unterschiede zwischen den Anlagen getestet. Die Sterberate bezeichnet die Anzahl der Todesfälle bezogen auf die Gesamtanzahl der Individuen in jeder Anlage. Die Gewichte der Bluteigel wurden zu Beginn des Versuches durch das gemeinsame Wiegen von 250 Bluteigeln bestimmt, die aus der Grundgesamtheit entnommen wurden. Aus diesem Gewicht wurde ein durchschnittliches Gewicht für die eingesetzten Bluteigel errechnet. Bei der Endauswertung wurden alle überlebenden Bluteigel aus den Anlagen entnommen, gezählt, auf ihren Gesundheitszustand hin beurteilt und zusammen gewogen. Hieraus wurde ein durchschnittliches Gewicht je Bluteigel ermittelt.

## **3 Durchführung der Versuche und Ergebnisse**

### **3.1 Durchführung und Ergebnisse der Versuche**

Auf Grund der vermuteten Zusammenhänge zwischen der chemischen Zusammensetzung und mikrobiellen Besiedlung des Haltungswassers einerseits und den Überlebensraten der Blutegel andererseits wurden die in 2.1.1 beschriebenen Wasserbehandlungssysteme konzipiert. Aufbauend auf den Erkenntnissen aus den Versuchen in der Pilotanlage wurde eine weitere Hauptversuchsanlage errichtet, in der drei Versuche durchgeführt wurden, die im Folgenden Fütterungsversuche 1 bis 3 heißen und in 3.1.7 ff. beschrieben sind.

Da für egeladäquate Wasserbehandlungssysteme keine erprobten Verfahren aus der Aquakultur in Frage kommen (1.1), wurde eine erste Versuchsreihe mit fünf verschiedenen verfahrenstechnischen Ansätzen (Pilotversuch) mit folgenden Zielen durchgeführt:

- Suche nach Hinweisen zu Zusammenhängen zwischen den chemisch-physikalischen Belastungen des Haltungswassers, den im Haltungsgefäß vorhandenen Mikroorganismen und dem Gesundheitszustand der Blutegel.
- Erste Prüfung ausgesuchter Wasserbehandlungssysteme, die das Haltungswasser qualitativ in einem für die Tiere zuträglichen Bereich halten sollen.

Nicht untersucht wurden die Blutegel auf spezielle Krankheiten. Sie wurden lediglich als gesund oder krank eingeordnet, gezählt und gewogen.

#### **3.1.1 Durchführung des Pilotversuchs**

Der Pilotversuch wurde am 01.08.2012 begonnen und am 12.10.2012 abgeschlossen. Am 06.09.2012 wurden alle Tiere mit defibriniertem, angewärmtem (ca. 38°C) Pferdeblut gefüttert. Dazu wurden die Tiere aus ihren Aquarien entnommen und in Eimer eingesetzt. Nach der Fütterung wurden die Tiere gewaschen und wieder in ihre Aquarien zurückgesetzt. Tiere, die nicht gefressen hatten, wurden aussortiert und erfasst (Kannibalismus). Dies wurde verbunden mit dem Entfernen von Häuten und sonstigen organischen Stoffen aus den Aquarien. In der EE-, der Bio- sowie der HF/UV-Anlage wurden jeweils 40 Liter, in der O<sub>3</sub>- und der Kontroll-Anlage jeweils 50% des Wassers gewechselt (O<sub>3</sub>: 100 Liter, Kontrolle: 92,5 Liter). In den beiden letztgenannten Anlagen waren die Nitrit- und Ammoniumkonzentrationen erkennbar angestiegen. Bei den Wasserwechseln wurden auch Verdunstungsverluste aufgefüllt.

Das Ende des Pilotversuches wurde für den 10.10.2012 geplant. Da an diesem Tag eine Probenahme für die mikrobiologischen Untersuchungen nicht möglich war, wurde diese um eine Woche auf den 17.10.2012 verschoben. Über das Wochenende 13./14.10. fielen in der HF/UV- und der Kontroll-Anlage Pumpen aus. Daher wurden die Anlagen am 15.10.2012 außer Betrieb genommen und die Blutegel ausgezählt. Die Einordnung der Tiere in „gesund“ und „krank“ geschah nach visueller Kontrolle. An folgenden Terminen wurden Proben für mikrobiologische Untersuchungen genommen: Erstbeprobung (t0: 01.08.2012), Folgeuntersuchungen (t2: 15.08.12; t4: 29.08.12; t6: 13.09.12; t8: 26.09.12). Auf eine letzte Probenahme vor der Auszählung der Blutegel wurde verzichtet.

### **3.1.2 Ergebnisse zur Verfahrenstechnik im Pilotversuch**

Hydraulisch liefen die Anlagen stabil. Da die Überläufe nur das überständige Wasser ablaufen ließen, hätten die Aquarien nicht trocken fallen oder überlaufen können, selbst wenn die Pumpen ausgefallen wären. Voraussetzung war das regelmäßige Reinigen (Abbürsten) der Edelstahlsiebe an den Überläufen. Die technischen Komponenten arbeiteten störungsfrei, abgesehen von dem Ozongenerator. Dieser lieferte nicht stabil die voreingestellte Menge O<sub>3</sub>, die Produktion schwankte offensichtlich, was optisch wahrnehmbar war. Hierbei handelte es sich um ein einfaches Gerät aus der Aquaristik. Ein höherwertiges Gerät hätte vermutlich weniger Probleme bereitet. Problematisch war die Ozonbelastung in der Raumluft, die vermutlich mittels Ableitung über eine Aktivkohlestufe hätte vermindert werden können.

Die EE-Anlage, die Bio-Anlage, sowie die Kontroll-Anlage liefen in den ersten beiden Wochen störungsfrei. Die Ammoniumkonzentration in der O<sub>3</sub>-Anlage stieg innerhalb der ersten Woche auf ca. 0,25 mg/l, so dass ein Teilwasserwechsel (60 Liter) durchgeführt wurde. Der Anstieg lag vermutlich an den erhöhten Ausscheidungen der Blutegel, eventuell ausgelöst durch das im Wasser gelöste Ozon. Der HF/UV-Reaktor gab viel Wärmeenergie in das Wasser ab und heizte dieses durch die Kreislaufführung kontinuierlich auf. Daher wurde ein elektrischer Durchlauf-Wasserkühler in den Kreislauf eingebunden, der die Temperatur auf 22,5°C begrenzte. Wegen des Strömungswiderstands des Kühlaggregats wurde eine zusätzliche Pumpe in dem Kreislauf eingebaut um die gewünschte Durchflussrate halten zu können. Da im Versuchsverlauf bei der EE-Anlage eine unbemerkte Kalamität (technischer Defekt, Temperatur, o.ä.) vermutet wurde, wäre der Einsatz einer automatisierten Messeinrichtung, beispielsweise für Temperatur oder auch andere potentiell relevante Parameter, sinnvoll gewesen.

### 3.1.3 Ergebnisse chemischer Wasserqualität im Pilotversuch

Für die Bewertung der Wasserqualität wurden die regelmäßig gemessenen Parameter Ammonium, Nitrit und Nitrat zu Grunde gelegt. Ebenfalls regelmäßig gemessen und dokumentiert wurden pH und Temperatur im Wasser

#### 3.1.3.1 EE-Anlage

Etwa 10 Tage nach dem Einsetzen der Blutegel konnte anhand der gemessenen Konzentrationen von Ammonium, Nitrit und Nitrat davon ausgegangen werden, dass eine Ammonium- und Nitritoxidation in den jeweiligen Filtern begonnen hatte. Wenige Tage nach dem Blutegeleinsetz hatte die Ammoniumkonzentration mit 0,15 mg/l einen vorläufigen Höhepunkt erreicht. Diese sank innerhalb weniger Tage auf ca. 0,05 mg/l, gleichzeitig stieg die Nitritkonzentration kurzfristig auf ca. 0,125 mg/l, um anschließend innerhalb weniger Tage wieder auf ca. 0,04 mg/l abzufallen, während die Nitratkonzentration bis zur Fütterung stetig auf 18 mg/l anstieg. Nach der Fütterung am 06.09.2012 kam es zu einem sprunghaften Anstieg der Ammonium- und Nitritkonzentrationen. Wenige Tage nach der Fütterung waren die Konzentrationen von Ammonium auf 0,18 mg/l und von Nitrit auf 0,37 mg/l angestiegen. Beide Anstiege verliefen parallel, da wohl genügend nitrifizierende Bakterien im System vorhanden waren. Die Oxidation von Nitrit zu Nitrat verlief etwas schneller und beide Konzentrationen erreichten etwa fünf Wochen nach der Fütterung fast wieder das Ausgangsniveau, während Nitrat in der Konzentration bis zum Versuchsende kontinuierlich bis auf ca. 60 mg/l anstieg (Abbildungen 14, 21).

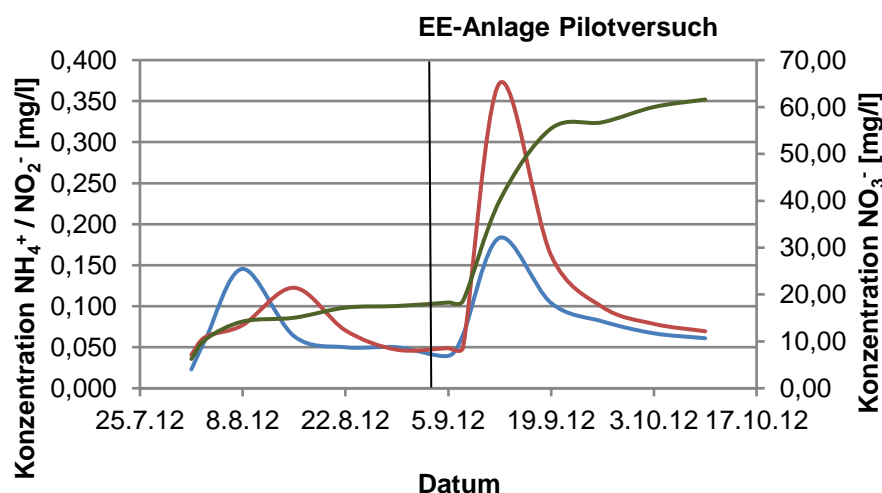


Abbildung 14: Konzentrationen der N-Produkte im Aquarienwasser, EE-Anlage, Pilotversuch. Senkrechte schwarze Linie zeigt den Fütterungszeitpunkt.

### 3.1.3.2 Bio-Anlage

Direkt nach dem Einsetzen der Bluteigel stieg die Ammoniumkonzentration kurzzeitig von 0,02 mg/l auf 0,035 mg/l an, um schnell auf die Ausgangskonzentration abzufallen. Nitrit stieg von einer Ausgangskonzentration von 0,04 mg/l ebenfalls kurzzeitig auf 0,05 mg/l, um schnell unter die Ausgangskonzentration bis auf 0,01 mg/l abzufallen. Während dessen stieg die Nitratkonzentration von 6 mg/l stetig auf 28 mg/l zum Fütterungszeitpunkt und kontinuierlich weiter auf 60 mg/l zum Ende des Messzyklus.

Nach dem anfänglichen leichten Anstieg der Ammonium- und Nitritkonzentrationen unmittelbar nach dem Einsetzen der Bluteigel war der große Biofilter innerhalb weniger Tage in der Lage, Ammonium und Nitrit zu oxidieren. Kurz vor der Fütterung stieg die Ammoniumkonzentration nochmals leicht an, direkt nach der Fütterung stiegen Nitrit auf 0,085 mg/l und Ammonium auf 0,082 mg/l deutlich steiler an, nahmen aber in den ersten drei Wochen nach der Fütterung bis zum Versuchsende wieder ab. Dieser Trend zeigte auch über das Versuchsende hinaus. Insgesamt blieben die Konzentrationen sehr stark hinter den Konzentrationen in der EE-Anlage zurück. Nitrat reicherte sich über den Versuchszeitraum kontinuierlich an, wobei der Konzentrationsanstieg etwa zwei Wochen nach der Fütterung deutlich abflachte. Bei Versuchsende lag sie bei 60 mg/l (Abbildung 15 und Abbildung 22).

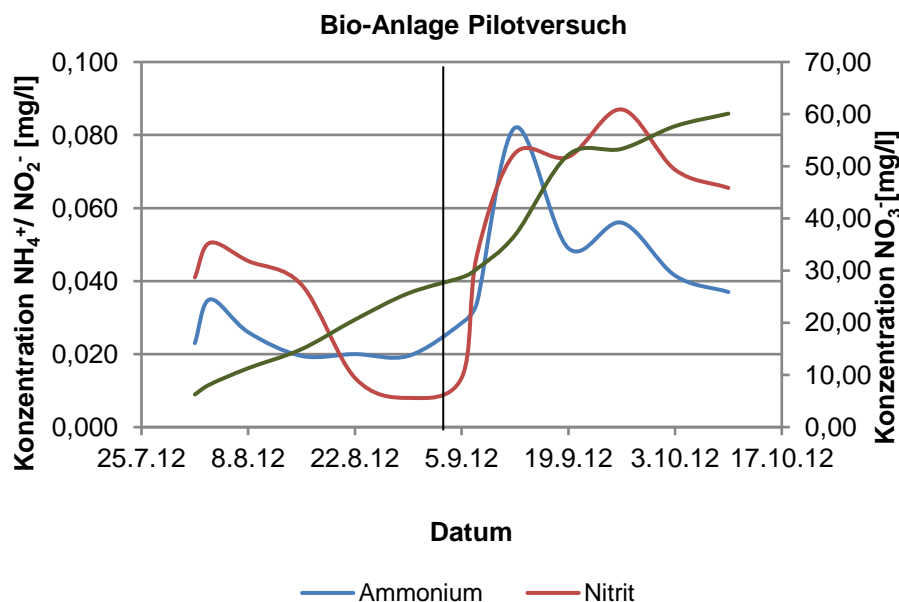


Abbildung 15: Konzentrationen der N-Produkte im Aquarienwasser, Bio-Anlage, Pilotversuch. Senkrechte schwarze Linie zeigt den Fütterungszeitpunkt.

### 3.1.3.3 HF/UV-Anlage

Die Ammoniumkonzentration stieg nach dem Einsetzen der Bluteigel in die HF/UV-Anlage von 0,02 mg/l kurzzeitig auf 0,06 mg/l an, fiel dann aber schnell auf die Ausgangskonzentration zurück, wo sie bis zum Fütterungszeitpunkt verblieb. Die Nitritkonzentration stieg nach dem Einsetzen der Bluteigel von 0,04 mg/l ebenfalls kurzfristig auf etwa 0,08 mg/l an, um innerhalb weniger Tage auf unter 0,02 mg/l abzufallen, wo sie bis zum Fütterungszeitpunkt blieb. Ab dem Fütterungszeitpunkt stieg die Ammoniumkonzentration steil auf 0,06 mg/l, um innerhalb etwa zwei Wochen wieder auf das Ausgangsniveau vor der Fütterung abzufallen. Die Nitritkonzentration stieg unmittelbar nach der Fütterung steil auf 0,09 mg/l und danach etwas flacher auf 0,105 mg/l, um bis zum Versuchsende auf 0,065 mg/l abzufallen. Nitrat konzentrierte sich ab Versuchsbeginn ausgehend von ca. 5 mg/l auf etwa 30 mg/l zum Zeitpunkt der Fütterung und nur leicht steiler auf über 70 mg/l bis zum Versuchsende auf (Abbildung 16 und 23).

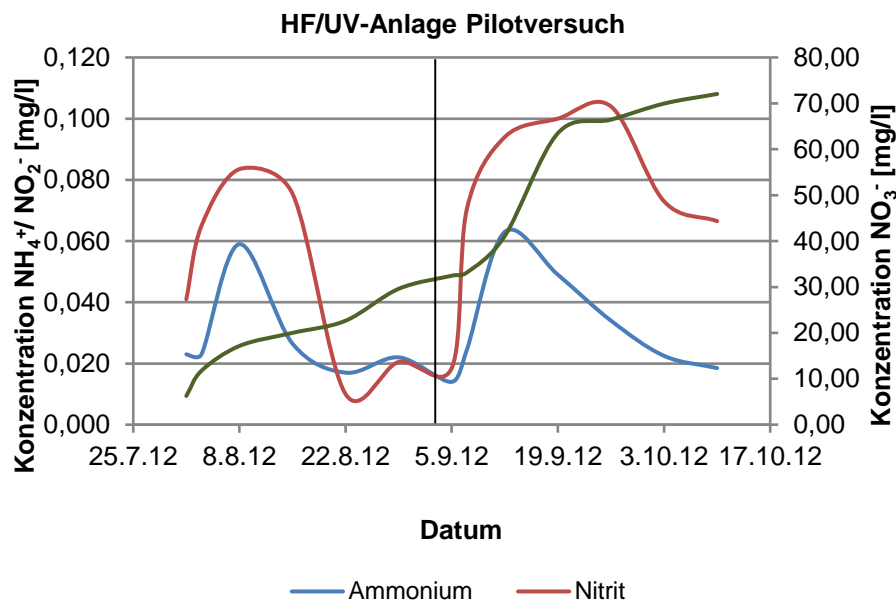


Abbildung 16: Konzentrationen der N-Produkte im Aquarienwasser, HF/UV-Anlage, Pilotversuch. Senkrechte schwarze Linie zeigt den Fütterungszeitpunkt.

### 3.1.3.4 O<sub>3</sub>-Anlage

Kurz nach dem Einsetzen der Blutegel stieg die Ammoniumkonzentration in der O<sub>3</sub>-Anlage leicht von 0,001 mg/l auf 0,25 mg/l an, um innerhalb etwa 2 Wochen wieder auf nahezu Ausgangsniveau abzusinken. Die Nitritkonzentration stieg leicht zeitversetzt und mit nahezu gleichen Werten an, um ebenfalls innerhalb weniger Tage wieder auf etwa Ausgangsniveau abzufallen. Zum Zeitpunkt der Fütterung lagen die Konzentrationen von Ammonium und Nitrit wieder nahe der Nachweisgrenze des eingesetzten Messverfahrens. Die Ammoniumkonzentration stieg ab dem Fütterungszeitpunkt innerhalb weniger Tage steil bis auf etwa 4,2 mg/l an, um etwa zwei Wochen nach der Fütterung wieder bis auf die Ausgangskonzentration abzufallen, wo sie bis zum Versuchsende verblieb. Nitrat stieg von etwa 8 mg/l bei Versuchsbeginn stetig auf etwa 22 mg/l zum Fütterungszeitpunkt, ab diesem etwas steiler auf rd. 54 mg/l bei Versuchsende (Abbildungen 17, 18 und 24).

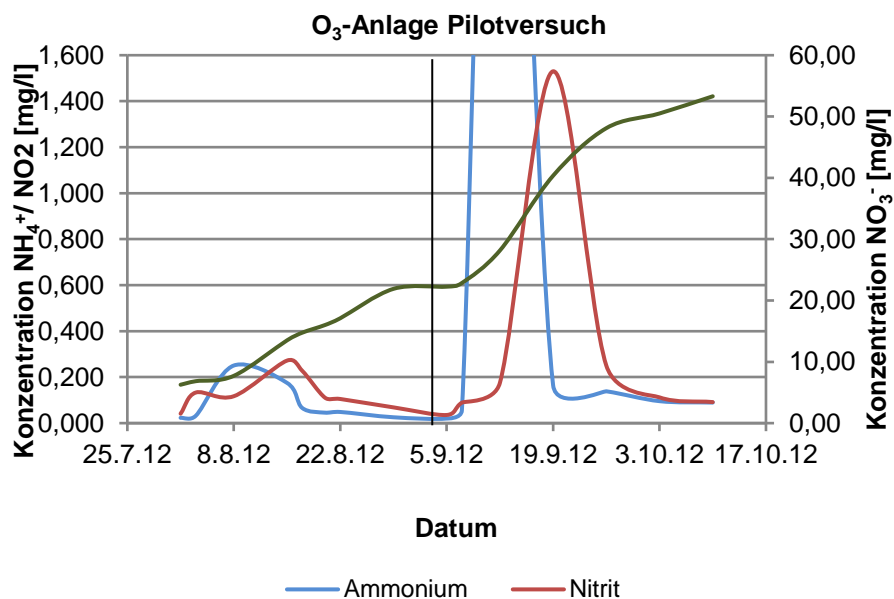


Abbildung 17: Konzentrationen der N-Produkte im Aquarienwasser, O<sub>3</sub>-Anlage (Ammonium s. separate Darstellung Abb. 18), Pilotversuch. Senkrechte schwarze Linie zeigt den Fütterungszeitpunkt.

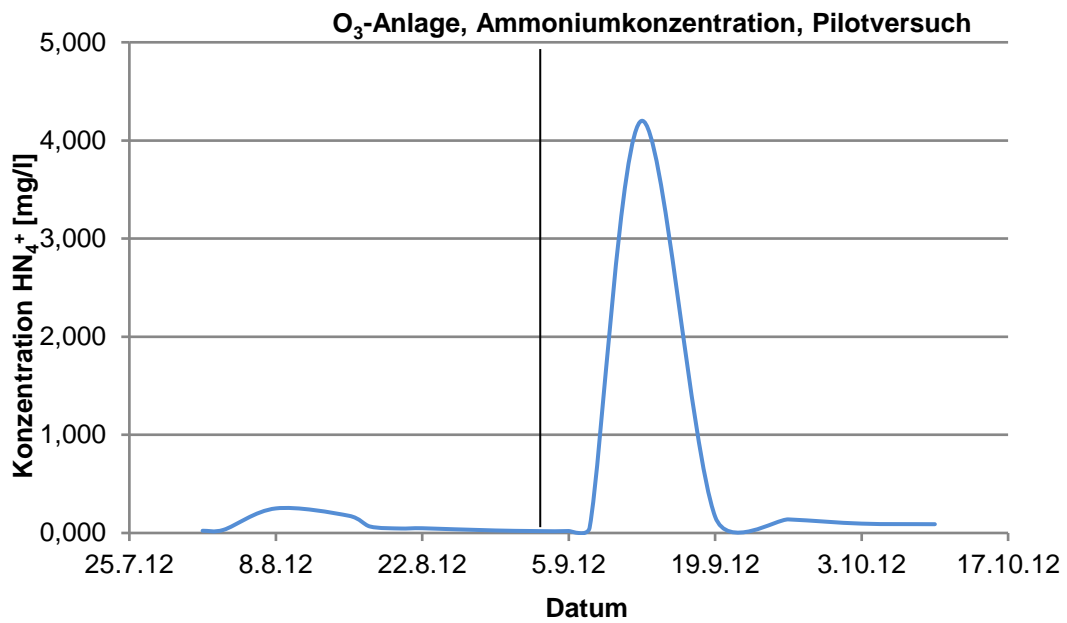


Abbildung 18: Separate Darstellung der Ammoniumkonzentration im Aquarienwasser der O<sub>3</sub>-Anlage, Pilotversuch. Senkrechte schwarze Linie zeigt den Fütterungszeitpunkt.

### 3.1.3.5 Kontroll-Anlage

Die Kontroll-Anlage war mit einem Kanisterfilter mit relativ kleiner Aufwuchsfläche für nicht-floatende Bakterien versehen. In den Aquarien der Kontroll-Anlage war der Konzentrationsverlauf von Ammonium, Nitrit und Nitrat ähnlich wie in den anderen Anlagen. Zuerst stieg innerhalb weniger Tage nach Einsetzen der Blutegel die Ammoniumkonzentration von nahe 0,0 mg/l auf ca. 0,1 mg/l, um dann wieder auf das Anfangsniveau abzufallen. Ab dem Zeitpunkt der Fütterung stieg die Konzentration dann innerhalb etwa einer Woche steil auf fast 0,4 mg/l und fiel ebenso steil innerhalb weniger Tage wieder auf das Konzentrationsniveau vor der Fütterung ab. Zeitlich leicht versetzt verlief der Konzentrationsverlauf beim Nitrit bis zur Fütterung, mit einem leichten Zwischenanstieg auf 0,18 mg/l und anschließendem Abfall auf nahezu Ausgangsniveau bis zum Fütterungszeitpunkt. Ab der Fütterung stieg die Ammoniumkonzentration für wenige Tage auf fast 0,4 mg/l, um anschließend etwa gleich schnell wieder auf ein Niveau nur leicht über dem Ausgangsniveau, auf etwa 0,05 mg/l abzufallen, wo es bis Versuchsende verblieb. Die Nitritkonzentration stieg unmittelbar nach der Fütterung innerhalb weniger Tage steil auf nahezu 5,5 mg/l an und fiel etwa gleich schnell wieder auf etwa die Ausgangskonzentration ab. Die Nitratkonzentration stieg von anfänglich ca. 6 mg/l auf nahezu 30 mg/l zum Zeitpunkt der Fütterung und anschließend weiter auf rd. 60 mg/l bis zum Versuchsende (Abbildungen 19, 20 und 25).

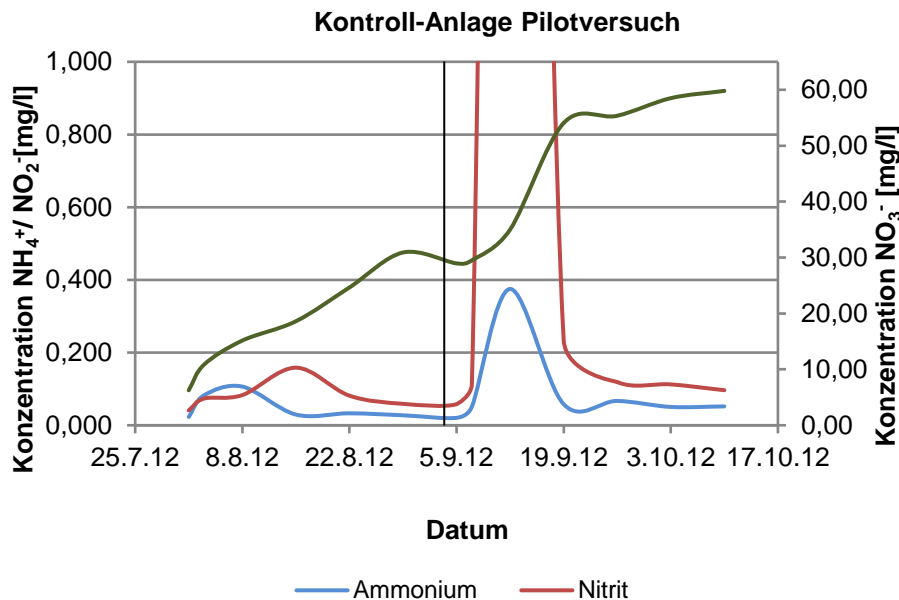


Abbildung 19: N-Produkte im Aquarienwasser, Kontroll-Anlage, (Nitrit s. separate Darstellung Abb. 20), Pilotversuch. Senkrechte schwarze Linie zeigt den Fütterungszeitpunkt.

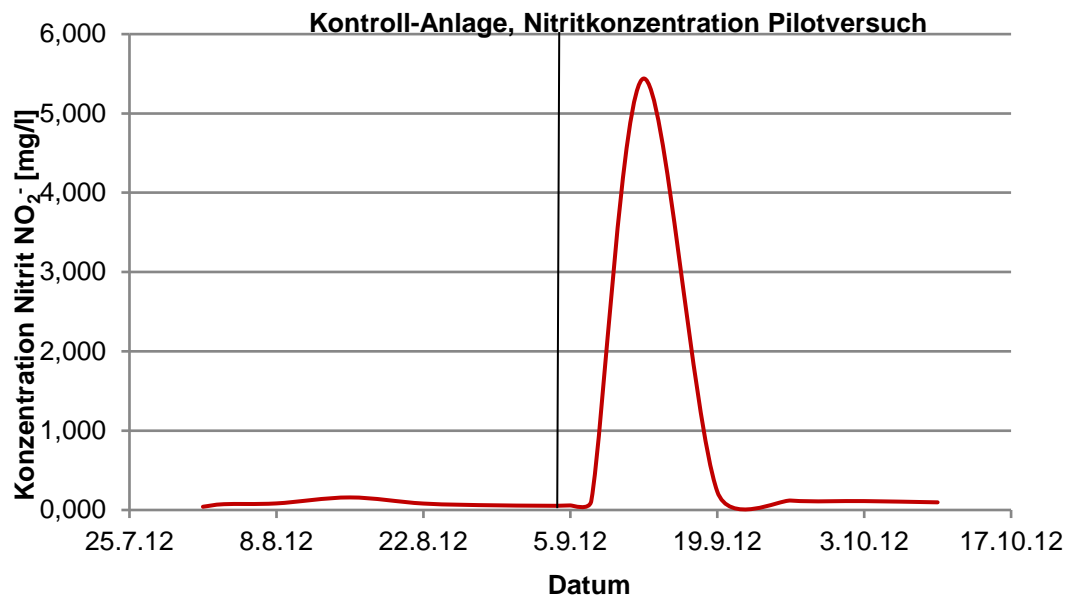


Abbildung 20: Nitrit im Aquarienwasser Kontroll-Anlage, separate Darstellung, Pilotversuch.  
Senkrechte schwarze Linie zeigt den Fütterungszeitpunkt.

### **Vergleichende Betrachtung der chemischen Wasserqualität Pilotversuch**

In allen Anlagen des Pilotversuchs konnte eine ähnlich verlaufende Anreicherung von Nitrat gemessen werden. Die Konzentration stieg in allen Anlagen bis zum Versuchsende auf 50 bis 70 mg/l. Während in der Bio- und der HF/UV-Anlage die Konzentrationsanstiege von Ammonium und Nitrit im Zusammenhang mit der Fütterung sehr gering ausfielen, war der Konzentrationsanstieg in der EE-Anlage zwar etwas stärker, aber ebenfalls recht gering. Völlig unterschiedlich reagierten Ammonium und Nitrit hingegen in den beiden weiteren Anlagen. In der O<sub>3</sub>-Anlage stieg die Ammoniumkonzentration unmittelbar nach der Fütterung stärker als in allen anderen Anlagen an, fiel dann aber auch in etwa gleichem Maße wieder ab. Der Konzentrationsan- und -abstieg fand beim Nitrit später statt und fiel wesentlich geringer aus. In der Kontroll-Anlage stieg die Ammoniumkonzentration stärker an als in den EE-, Bio- und HF/UV-Anlagen. Auffällig stark stieg hier die Nitritkonzentration, zeitgleich mit der Ammoniumkonzentration, auf die höchste Konzentration aller Anlagen. Auch die Konzentrationsabnahme bis auf nahezu das Ausgangsniveau verlief zeitlich parallel.

Im den folgenden Abbildung 21 bis Abbildung 25 wird der Konzentrationsverlauf von Ammonium, Nitrit und Nitrat grafisch mit identischer Skalierung der Achsen dargestellt, um die Verläufe besser vergleichen zu können.

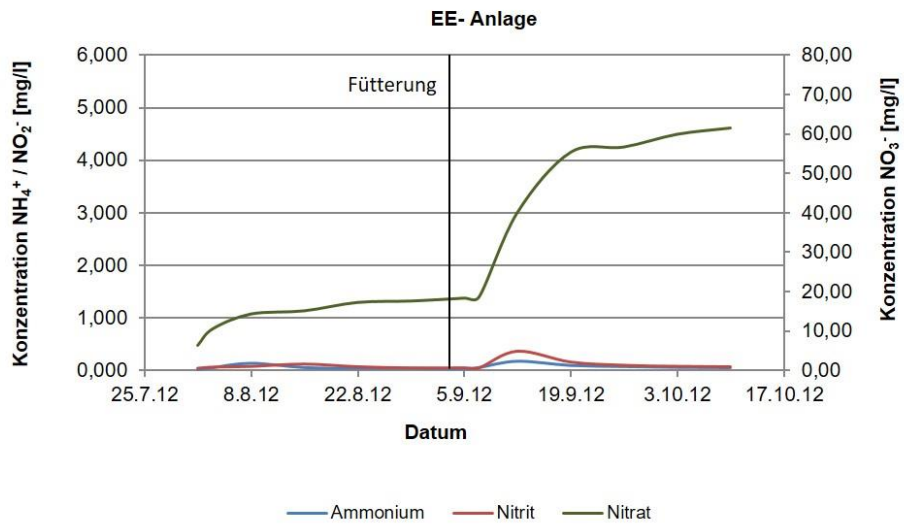


Abbildung 21: Konzentrationsverlauf N-Produkte in EE-Anlagenwasser, Pilotversuch. Senkrechte schwarze Linie zeigt den Fütterungszeitpunkt.

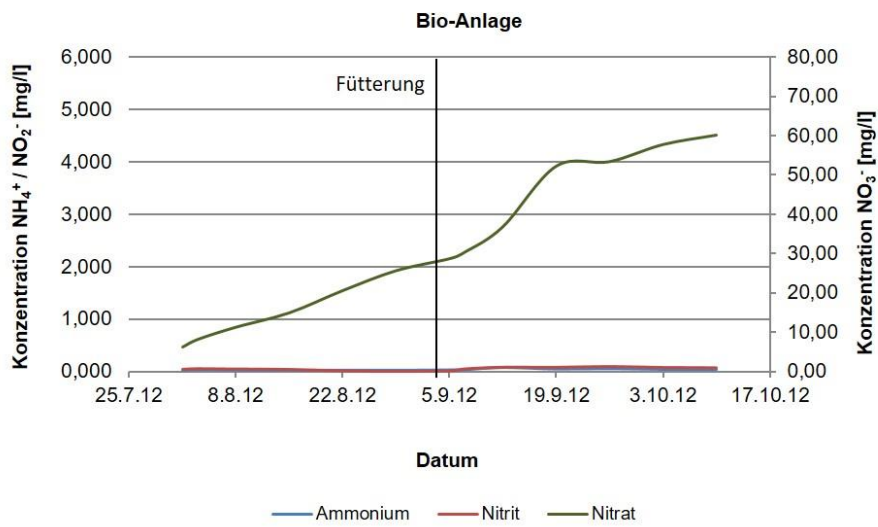


Abbildung 22: Konzentrationsverlauf N-Produkte in Bio-Anlagenwasser, Pilotversuch. Senkrechte schwarze Linie zeigt den Fütterungszeitpunkt.

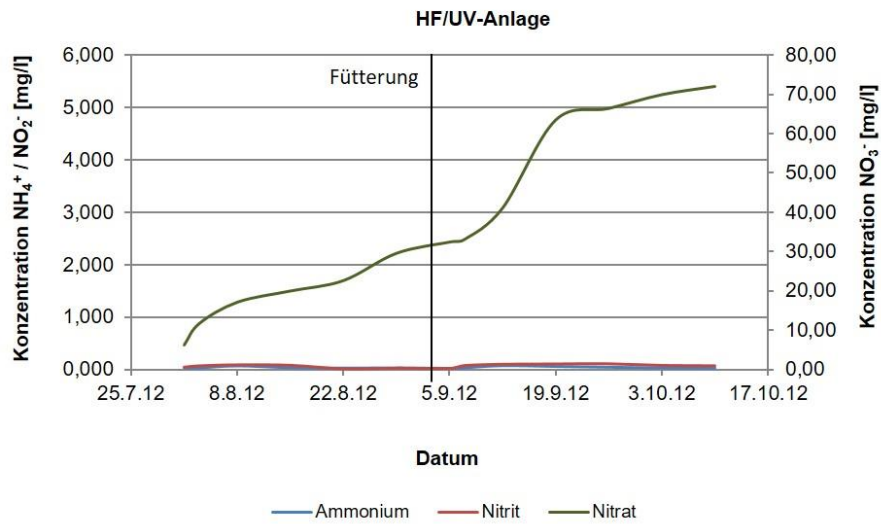


Abbildung 23: Konzentrationsverlauf N-Produkte in HF/UV-Anlagenwasser, Pilotversuch. Senkrechte schwarze Linie zeigt den Fütterungszeitpunkt.

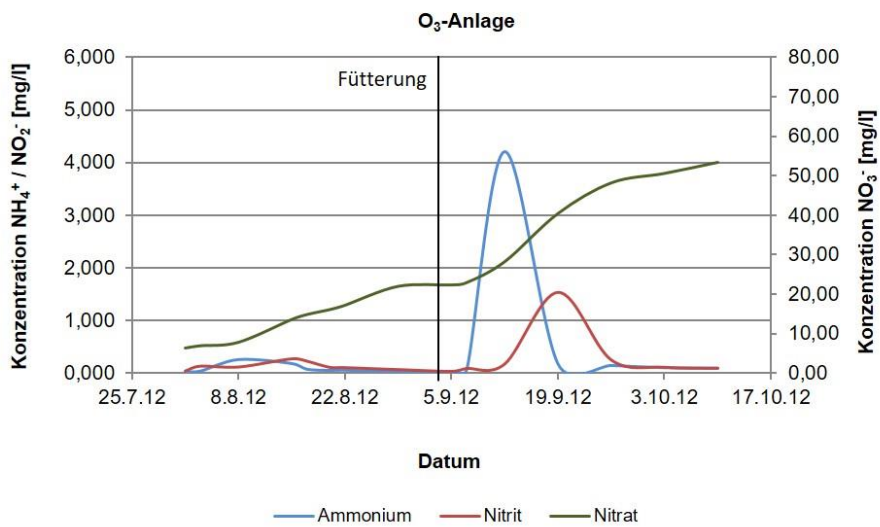


Abbildung 24: Konzentrationsverlauf N-Produkte in O<sub>3</sub>-Anlagenwasser, Pilotversuch. Senkrechte schwarze Linie zeigt den Fütterungszeitpunkt.

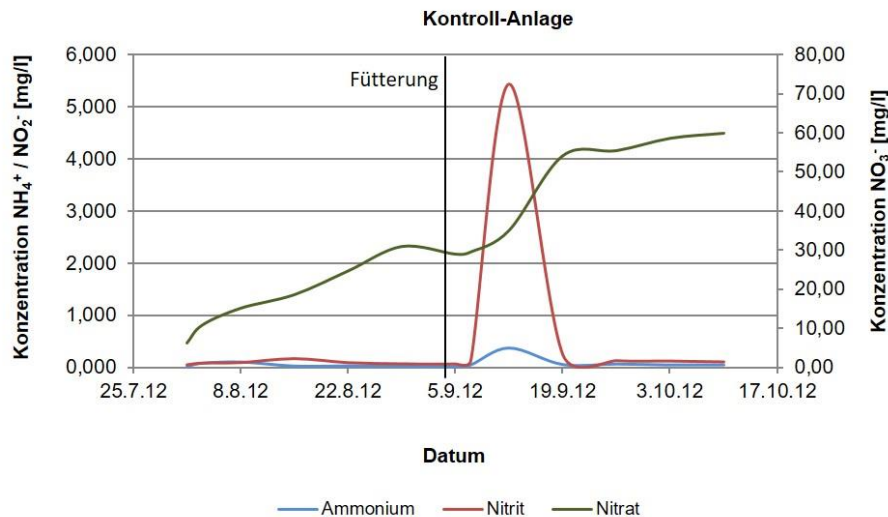


Abbildung 25: Konzentrationsverlauf N-Produkte in Kontroll-Anlagenwasser, Pilotversuch.  
Senkrechte schwarze Linie zeigt den Fütterungszeitpunkt.

### 3.1.4 Ergebnisse mikrobiologische Untersuchungen des Wassers im Pilotversuch

Die Befüllung der Anlage erfolgte mit Leitungs- und Teichwasser (Mischungsverhältnis 1:2, s. 2.1.1). Ausgangspunkt für die Berechnung der Bakterienkonzentrationen war eine Beprobung des Wassers vor dem Einsetzen der Bluteigel am 01.08.2012. Es wurde nur eine Wasserprobe gezogen und analysiert, da alle Anlagen mit demselben Wasser befüllt wurden. Die Konzentration der auf R2A-Agar kultivierbaren Organismen lag bei  $10^5$  KBE/ml, die Konzentration der auf EMB-Agar kultivierbaren Organismen bei  $10^3$  KBE/ml.

#### 3.1.4.1 EE-Anlage

Zum Zeitpunkt der zweiten Probenahme, nach dem Einsetzen der Bluteigel, war die Konzentration der Mikroorganismen in der EE-Anlage, die auf EMB-Agar wachsen, in den ersten Wochen nicht, erst kurz vor der Fütterung von  $10^3$  auf  $10^4$  KBE/ml angestiegen. Die Konzentration der auf R2A wachsenden Organismen sank zwischen der ersten und zweiten Probenahme von  $10^5$  auf  $10^4$  KBE/ml. Die Blutfütterung wirkte sich ebenfalls unterschiedlich auf die auf den jeweiligen Substraten wachsenden Organismen aus. Die auf R2A wachsenden Organismen waren nach der Blutfütterung in unveränderter Konzentration nachweisbar, während die auf EMB kultivierbaren Bakterien unmittelbar nach der Fütterung in etwas geringerer Konzentration, aber etwa 14 Tage später in erhöhter Konzentration ( $10^5$  KBE/ml) nachweisbar waren (Abbildung 26).

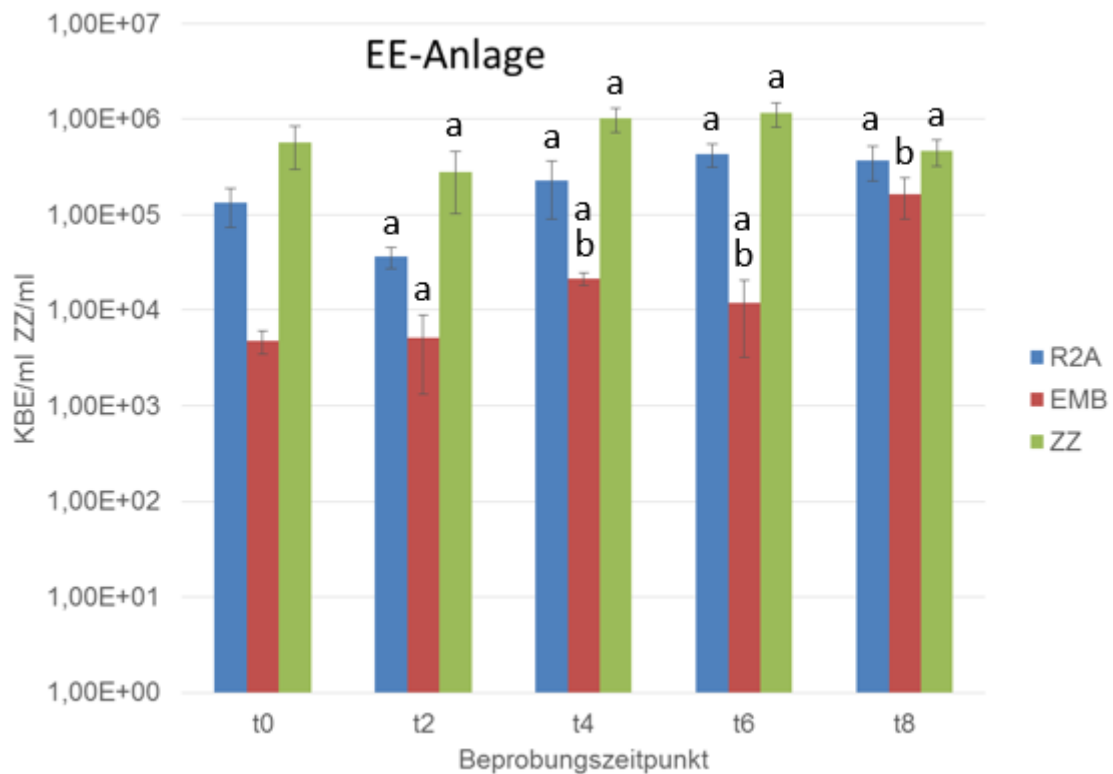


Abbildung 26: Halblogarithmische Darstellung der Konzentration auf R2A und EMB kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (KBE/ml Wasser) sowie der Gesamtzellzahl/ml Wasser (ZZ) der EE-Anlage im Pilotversuch. Dargestellt i. F. eines Balkendiagramms mit statistischer Auswertung, ANOVA-Analyse mit Tukey Test durchgeführt in SigmaPlot; unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ . Gezeigt sind Konzentrationen kultivierbarer Bakterien als Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe in logarithmischer Darstellung je Probenahmezeitpunkt. Dargestellt sind die Mittelwerte für die jeweils zwei parallel geschalteten Aquarien mit entsprechenden Standardabweichungen. Die Unterschiede, die sich zwischen den dreifachen Ausplattierungen je Aquarium Probe ergaben, wurden durch Fehlerfortpflanzung berücksichtigt. tx: Probenahmezeitpunkte angegeben in Wochen. Die Fütterung erfolgte zwischen t0 und t2.

### 3.1.4.2 Bio-Anlage

Im Wasser der Biofilteranlage sank die Konzentration der auf R2A kultivierbaren Organismen von  $10^5$  bis zur Blutfütterung der Blutegel auf  $10^3$  KBE/ml, um nach der Fütterung wieder auf  $10^5$  KBE/ml anzusteigen. Die Konzentration der auf EMB kultivierbaren Mikroorganismen erhöhte sich erst nach dem Einsetzen der Blutegel kurz von  $10^3$  auf  $10^4$  KBE/ml, um bis kurz vor der Fütterung wieder auf  $10^3$  KBE/ml abzusinken. Nach der Fütterung stieg die Konzentration leicht an, blieb aber im Versuchszeitraum in dem Bereich von  $10^3$  KBE/ml (Abbildung 27).

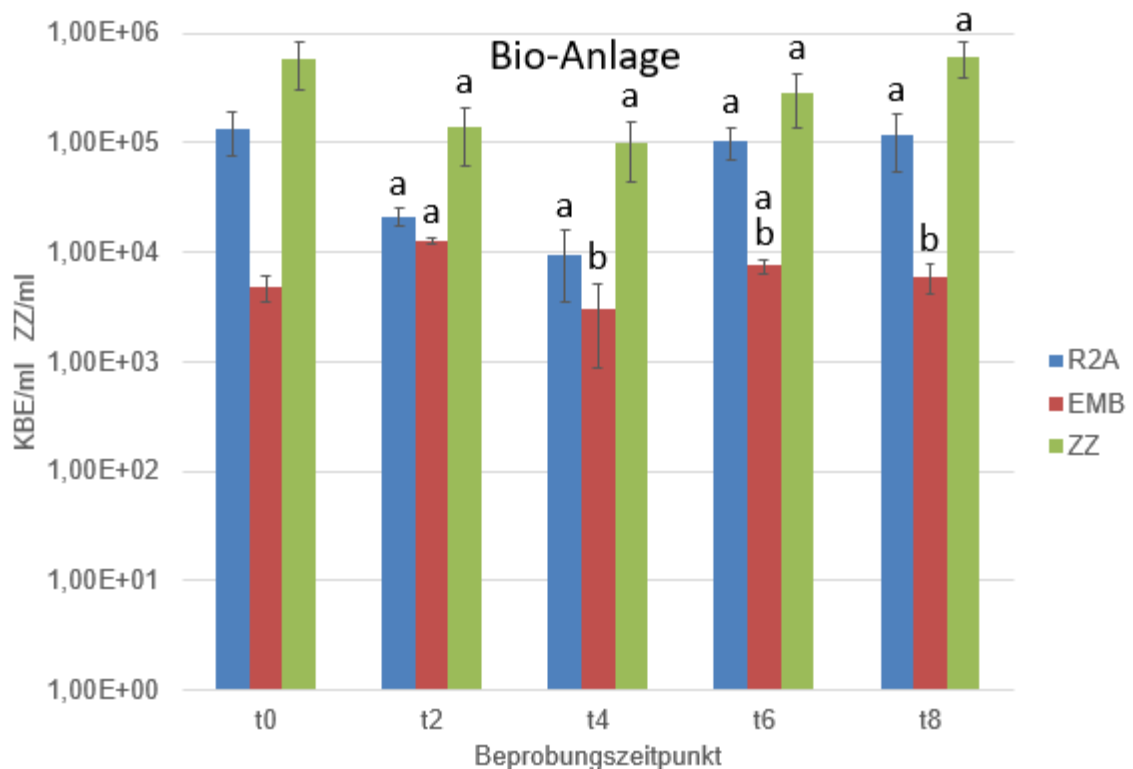


Abbildung 27: Halblogarithmische Darstellung der Konzentration auf R2A und EMB kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (KBE/ml Wasser) sowie der Gesamtzellzahl/ml Wasser (ZZ) der Bio-Anlage im Pilotversuch. Dargestellt i. F. eines Balkendiagramms mit statistischer Auswertung, ANOVA-Analyse mit Tukey Test durchgeführt in SigmaPlot; unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ . Gezeigt sind Konzentrationen kultivierbarer Bakterien als Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe in logarithmischer Darstellung je Probenahmezeitpunkt. Dargestellt sind die Mittelwerte für die jeweils zwei parallel geschalteten Aquarien mit entsprechenden Standardabweichungen. Die Unterschiede, die sich zwischen den dreifachen Ausplattierungen je Aquarium Probe ergaben, wurden durch Fehlerfortpflanzung berücksichtigt. tx: Probenahmezeitpunkte angegeben in Wochen. Die Fütterung erfolgte zwischen t0 und t2.

### 3.1.4.3 HF/UV-Anlage

Die Konzentration der Mikroorganismen im Wasser der HF/UV-Anlage, die auf R2A wachsen, sank ab dem Einsetzen der Bluteigel bis zur Blutfütterung von  $10^5$  auf  $10^3$  KBE/ml. Nach der Fütterung stieg die Konzentration auf  $10^4$  KBE/ml, sank aber bis zum Versuchsende wieder auf  $10^3$  KBE/ml. Der Konzentrationsverlauf der auf EMB nachweisbaren Organismen entwickelte sich annähernd parallel. Bei der ersten Beprobung lag eine Konzentration von  $10^3$  KBE/ml vor, die bis zur Fütterung bis auf  $10^1$  KBE/ml abnahm, um nach der Fütterung wieder leicht auf  $10^2$  KBE/ml anzusteigen, wo sie bis zum Versuchsende verblieb (Abbildung 28).

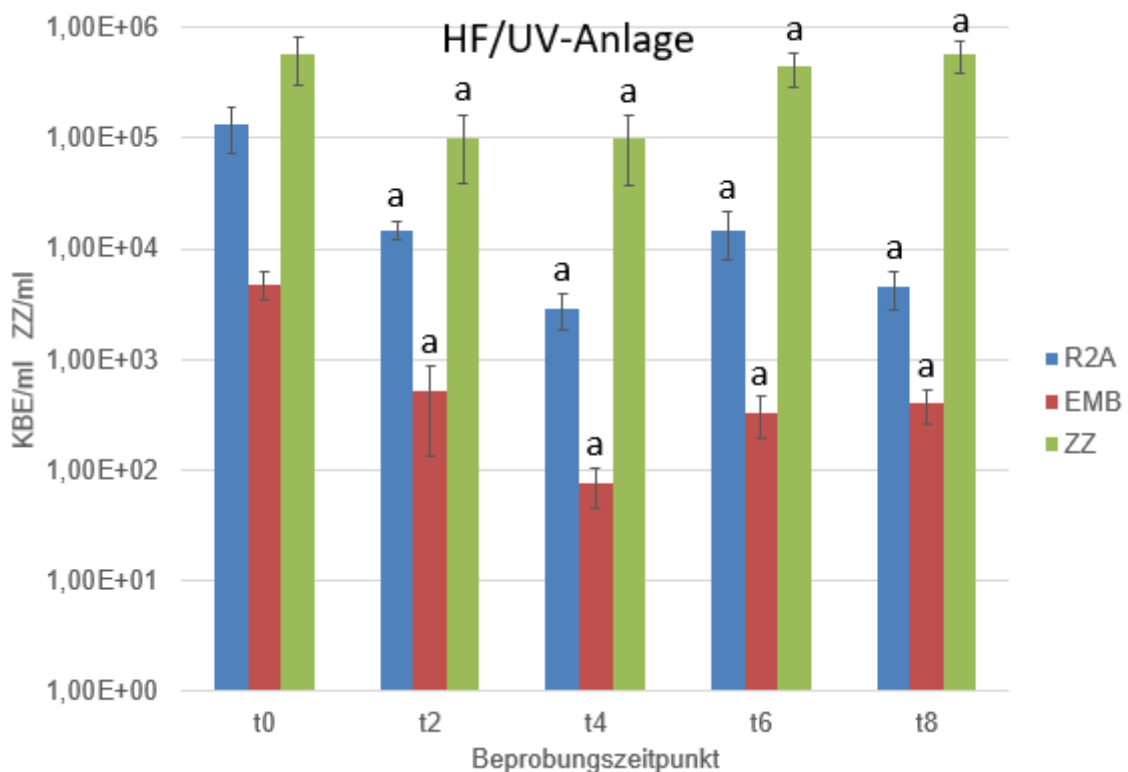


Abbildung 28: Halblogarithmische Darstellung der Konzentration auf R2A und EMB kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (KBE/ml Wasser) sowie der Gesamtzellzahl/ml Wasser (ZZ) der HF/UV-Anlage im Pilotversuch. Dargestellt i. F. eines Balkendiagramms mit statistischer Auswertung, ANOVA-Analyse mit Tukey Test durchgeführt in SigmaPlot; unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ . Gezeigt sind Konzentrationen kultivierbarer Bakterien als Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe in logarithmischer Darstellung je Probenahmezeitpunkt. Dargestellt sind die Mittelwerte für die jeweils zwei parallel geschalteten Aquarien mit entsprechenden Standardabweichungen. Die Unterschiede, die sich zwischen den dreifachen Ausplattierungen je Aquarium Probe ergaben, wurden durch Fehlerfortpflanzung berücksichtigt. tx: Probenahmezeitpunkte angegeben in Wochen. Die Fütterung erfolgte zwischen t0 und t2.

### 3.1.4.4 O<sub>3</sub>-Anlage

Ähnlich wie in der HF/UV-Anlage verhielt sich der Konzentrationsverlauf in der O<sub>3</sub>-Anlage. Die auf R2A nachweisbaren Mikroorganismen waren nach dem Einsetzen der Blutegel in einer Konzentration von 10<sup>5</sup> KBE/ml nachweisbar, die Konzentration nahm bis zur Fütterung auf 10<sup>3</sup> KBE/ml ab. Nach der Fütterung stieg die Konzentration wieder auf 10<sup>4</sup> KBE/ml und blieb nahezu unverändert bis zum Versuchsende. Auch die auf EMB kultivierbaren Organismen hatten nach dem Einsetzen der Blutegel mit 10<sup>3</sup> KBE/ml ihre höchste Konzentration, die bis zu Fütterung auf 10<sup>2</sup> KBE/ml abnahm und nach der Fütterung wieder leicht zunahm, aber im Bereich von 10<sup>2</sup> KBE/ml blieb (Abbildung 29).

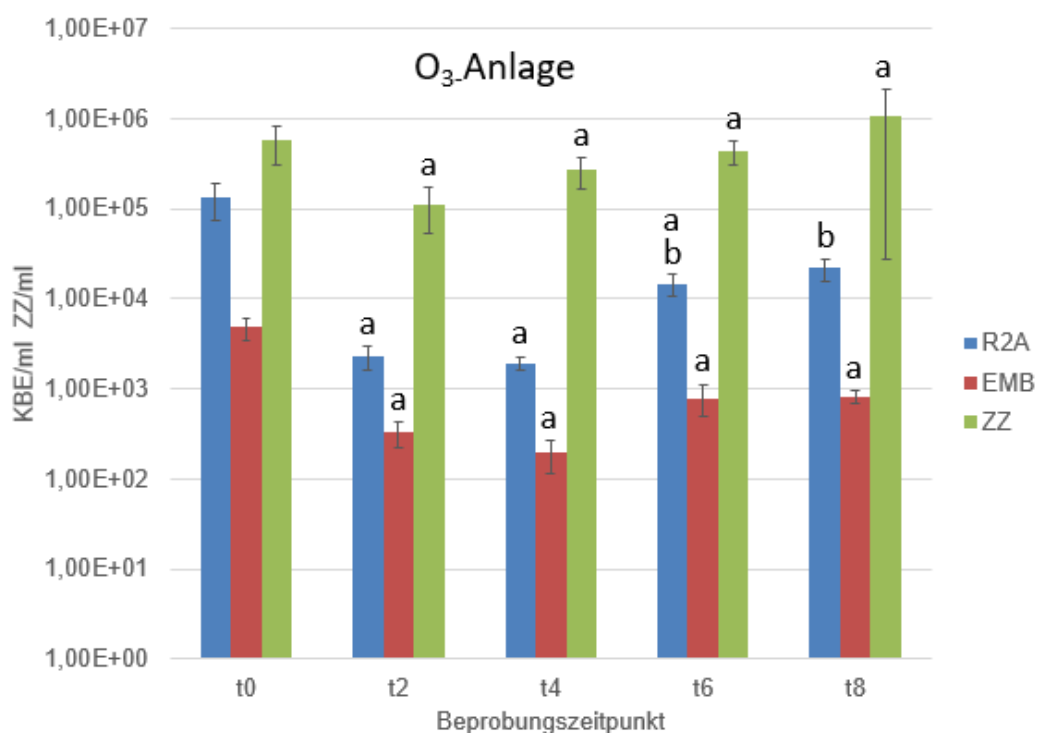


Abbildung 29: Halblogarithmische Darstellung der Konzentration auf R2A und EMB kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (KBE/ml Wasser) sowie der Gesamtzellzahl/ml Wasser (ZZ) der O<sub>3</sub>-Anlage im Pilotversuch. Dargestellt i. F. eines Balkendiagramms mit statistischer Auswertung, ANOVA-Analyse mit Tukey Test durchgeführt in SigmaPlot; unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ . Gezeigt sind Konzentrationen kultivierbarer Bakterien als Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe in logarithmischer Darstellung je Probenahmezeitpunkt. Dargestellt sind die Mittelwerte für die jeweils zwei parallel geschalteten Aquarien mit entsprechenden Standardabweichungen. Die Unterschiede, die sich zwischen den dreifachen Ausplattierungen je Aquarium Probe ergaben, wurden durch Fehlerfortpflanzung berücksichtigt. tx: Probenahmezeitpunkte angegeben in Wochen. Die Fütterung erfolgte zwischen t0 und t2.

### 3.1.4.5 Kontroll-Anlage

Die Mikroorganismen im Wasser der Kontroll-Anlage, die auf R2A wuchsen, lagen zu Versuchsbeginn in einer Konzentration von  $10^5$  KBE/ml vor. Bis zur Fütterung der Bluteigel nahm diese leicht auf  $10^4$  KBE/ml ab, um direkt nach der Fütterung auf eine Konzentration von  $10^5$  KBE/ml anzusteigen, der höchsten Konzentration im Versuchsverlauf. Die auf EMB kultivierbaren Organismen nahmen in ihrer Konzentration nach dem Einsetzen der Bluteigel von  $10^3$  KBE/ml bis zur Fütterung und darüber hinaus bis zum Versuchsende auf  $10^4$  KBE/ml zu (Abbildung 30).

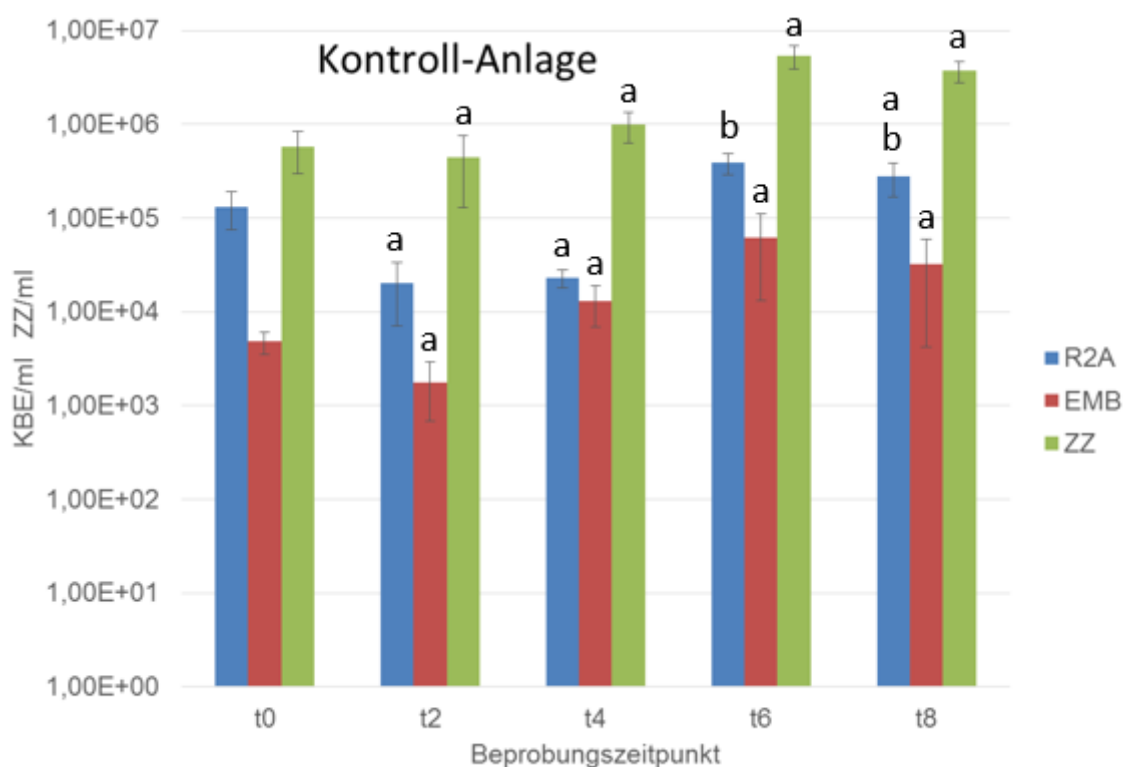


Abbildung 30: Halblogarithmische Darstellung der Konzentration auf R2A und EMB kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (KBE/ml Wasser) sowie der Gesamtzellzahl/ml Wasser (ZZ) der Kontroll-Anlage im Pilotversuch. Dargestellt i. F. eines Balkendiagramms mit statistischer Auswertung, ANOVA-Analyse mit Tukey Test durchgeführt in SigmaPlot; unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ . Gezeigt sind Konzentrationen kultivierbarer Bakterien als Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe in logarithmischer Darstellung je Probenahmezeitpunkt. Dargestellt sind die Mittelwerte für die jeweils zwei parallel geschalteten Aquarien mit entsprechenden Standardabweichungen. Die Unterschiede, die sich zwischen den dreifachen Ausplattierungen je Aquarium Probe ergaben, wurden durch Fehlerfortpflanzung berücksichtigt. tx: Probenahmezeitpunkte angegeben in Wochen. Die Fütterung erfolgte zwischen  $t_0$  und  $t_2$ .

## **Vergleichende Betrachtung Mikrobiologie Pilotversuch**

In allen Anlagen und bei allen Untersuchungen war der Konzentrationsverlauf insofern parallel, als bei einer Konzentrationszunahme von auf R2A kultivierbarer Bakterien auch eine Konzentrationszunahme bei auf EMB kultivierbaren Bakterien wie *Enterobacteriaceae* zu sehen war. Die Konzentration der auf EMB kultivierbaren Bakterien war bei allen Untersuchungen, unabhängig von der Anlage, immer niedriger als die Konzentration der auf R2A wachsenden Mikroorganismen. Ebenfalls bei allen Anlagen zu beobachten war, dass die Konzentration der Mikroorganismen, unabhängig von dem verwendeten Substrat, nach der Fütterung anstieg. Die beiden technischen Wasserbehandlungsverfahren Ozonisierung und HF/UV-Bestrahlung zeigten einen deutlichen Effekt in Hinblick auf die Reduzierung der Konzentration der Bakterien, wobei die HF/UV-Anlage auch die Konzentration nach einem Peak unmittelbar nach der Blutfütterung der Blutegel wieder erkennbar reduzieren konnte, während bei der Ozonisierung im Versuchszeitraum ein solcher Effekt nicht erkennbar war.

### **3.1.5 Verhalten der Blutegel im Pilotversuch**

Die Blutegel verhielten sich insbesondere in der EE-Anlage auffällig anders als in den anderen Anlagen. Sehr stark differierten zwischen den Anlagen die Zahlen von überlebenden und gesunden Tieren (Tabelle 8).

#### **3.1.5.1 EE-Anlage**

- Die Blutegel verließen nach der Zugabe von Eichenextrakt jedes Mal das Wasser und hefteten sich oberhalb des Wasserspiegels an die Aquarienwand; die Reaktion wurde im Versuchsverlauf schwächer, blieb aber sichtbar.
- Bei der Endauszählung hatten 53% der Tiere überlebt, 43% der Ausgangsmenge waren gesund, auffallend groß, vital und mit glänzender Haut.

#### **3.1.5.2 Bio-Anlage**

- Die Blutegel zeigten während des Versuchs keine Verhaltensauffälligkeiten.
- Bei der Endauszählung hatten 53% überlebt, 16% der Ausgangsmenge waren gesund.

#### **3.1.5.3 HF/UV-Anlage**

- Die Blutegel zeigten während des Versuchs keine Verhaltensauffälligkeiten.
- Bei der Endauszählung hatten 63% überlebt, 36% der Ausgangsmenge waren gesund.

#### **3.1.5.4 O<sub>3</sub>-Anlage**

- Die Blutegel zeigten während des Versuchs keine Verhaltensauffälligkeiten.
- Bei der Endauszählung hatten 58% überlebt, 25% der Ausgangsmenge waren gesund.

### 3.1.5.5 Kontroll-Anlage

- Die Tiere zeigten während des Versuchs keine Verhaltensauffälligkeiten.
- Bei der Endauszählung hatten 31% überlebt, 11% der Ausgangsmenge waren gesund.

Grafiken zu der Endauszählung siehe Abbildungen A1 bis A5 im Anhang.

Tabelle 8: Auszählung der Bluteigel am Ende des Pilotversuchs bei einer Ausgangsmenge von 400 Tieren je Anlage. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosioseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

	Überlebende Bluteigel		Gesunde Bluteigel	
	Anzahl	%	Anzahl	%
EE-Anlage	213	53,25	172	43,00
Bio-Anlage	213	53,25	64	16,00
HF/UV-Anlage	253	63,25	147	36,75
O <sub>3</sub> -Anlage	233	58,25	101	25,25
Kontroll-Anlage	127	31,75	44	11,00

### Vergleichende Betrachtung der Bluteigel nach Ende des Pilotversuchs

Da nur gesunde Bluteigel in den Verkauf kommen und für kranke keine weitere Verwendung besteht, ist die Rate der gesunden Bluteigel die relevante Größe. Die meisten gesunden Bluteigel waren in der EE-Anlage zu finden, gefolgt von der HF/UV- und der O<sub>3</sub>-Anlage. Auch optisch machten die Bluteigel aus der EE-Anlage den gesündesten und vitalsten Eindruck. Dies deutete darauf hin, dass das saure Milieu, in dem sie über die Versuchsdauer gehältert wurden, einen positiven Einfluss auf ihre Gesundheit haben könnte. Dies deckt sich auch mit in der Literatur zu findenden Angaben über das natürliche Lebensumfeld der Bluteigel. Dass in dieser Anlage nicht die größte Zahl an Bluteigel überlebt hat, führten wir auf eine nicht wahrgenommene Katastrophe zurück. Während des Versuchs machten die Tiere in der EE-Anlage nahezu durchgängig einen sehr guten Eindruck, das Sterben einer größeren Zahl fand konzentriert über ein Wochenende statt.

Die Bluteigel aus den beiden Anlagen mit Wasserdesinfektion (HF/UV- und O<sub>3</sub>-Anlage) hatten etwas niedrigere Überlebensraten als die aus der EE-Anlage. Allerdings lagen sie deutlich über denen der beiden Anlagen, die mit (kleinem bzw. großem) biologischen Filtern versehen waren. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass eine gewisse Desinfektion des Haltungswassers ebenfalls positiv auf die Bluteigelgesundheit wirkt. Die ausschließliche Filterung des zirkulierenden Wassers über eine Biofilteranlage alleine konnte die Ansprüche der Bluteigel an ihr Haltungsumfeld anscheinend nicht ausreichend sicherstellen.

### **3.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse Pilotversuch**

Die bei der Gläserhaltung periodisch problematische Sauerstoffsättigung des Wassers war in den Aquarien aller Kreislaufanlagen unproblematisch. Die ständige Umwälzung, verbunden mit dem kontinuierlichen Zulauf von Wasser im freien Auslauf, sorgte für eine zuverlässig gute Sauerstoffversorgung des Wassers.

Bewertungsparameter für die Effektivität der Wasserbehandlungstechniken hinsichtlich der Bluteigelhaltung und -aufzucht war die Anzahl der gesunden Tiere nach Abschluss des Versuches. Die meisten gesunden Bluteigel kamen aus den Aquarien der EE-Anlage, sie machten einen vitalen Eindruck, waren relativ groß und hatten eine glänzende Haut. Dass etwa vier Wochen nach der Fütterung innerhalb kurzer Zeit viele Tiere starben und so das Gesamtergebnis stark beeinträchtigten, wurde auf eine unbemerkt gebliebene Kalamität zurückgeführt. Daher wurde die Effektivität der Bluteigelhaltung in saurem Milieu näher untersucht (Fütterungsversuche).

Die verschiedenen Wasserbehandlungsmethoden führten zu anlagenspezifisch verlaufenden Ammonium-Abbauprozessen. Die Zeiträume, bis die Mikroorganismen in den Filtern Ammonium und Nitrit oxidierten, unterschieden sich. Ob erhöhte Konzentrationen einzelner N-Verbindungen zu Erkrankung und Sterben der Bluteigel führen kann, wurde nicht näher untersucht.

Nach der Fütterung stieg die Konzentration kultivierbarer wasserassoziierter Bakterien in allen Anlagen an, nahm dann aber wieder ab. Am geringsten war der Anstieg in der EE-Anlage. In wieweit potentiell egepathogene Organismen gefördert oder unterdrückt wurden, wurde nicht untersucht.

### **3.1.7 Durchführung und Ergebnisse Fütterungsversuch 1**

#### **3.1.7.1 Durchführung Fütterungsversuch 1**

Die Erstbefüllung der Anlagen der Haupt-Versuchsanlage mit Leitungswasser für die Fütterungsversuche erfolgte am 15.11.13, so dass sich die Wassertemperatur an die Raumtemperatur angleichen konnte, bevor Blutegel eingesetzt wurden. Alle technischen Einrichtungen wurden in den Tagen vor Versuchsstart auf ihre Funktion geprüft. In der EE-Anlage wurde der pH mittels manueller Zugabe von Eichenextrakt auf 6,4 abgesenkt, die RO-Anlage wurde mit aufgesalzenem RO-Wasser befüllt, das mittels CO<sub>2</sub> auf pH 6,7 abgesenkt wurde.

Das mikrobiologische Monitoring in Fütterungsversuch 1 wurde am 21.11.2013 mit den ersten Beprobungen gestartet (Abbildung 31). Der Umfang der mikrobiologischen Untersuchungen ist in 2.2.3 beschrieben. Am 22.11.2013 wurden die Blutegel eingesetzt.

In die neun Aquarien wurden je 500 *H. verbana* aus der gleichen Charge (Grundgesamtheit) mit möglichst gleicher Größe gewogen und eingesetzt. Vor der Fütterung wurde das Wasser aus den Aquarien bis auf etwa 2 cm abgelassen. Die Fütterung erfolgte am 03.01.2014 mittels mechanisch defibriertem und auf 38°C erwärmtem Blut von einem Pferd, das 2,5 Stunden vorher geschlachtet worden war. Das Blut wurde in medizinischen Schutzhüllen angeboten. Nachdem die Blutegel gefressen hatten, wurden die Aquarien gespült und der Wasserstand wieder auf das vorige Niveau angehoben. Dazu wurde Wasser mit annähernder Raumtemperatur aus den jeweiligen Puffertanks, ergänzt durch Leitungs- bzw. RO-Wasser, verwendet. Tiere, die erkennbar nicht gefressen hatten, wurden aus den Anlagen entfernt und gezählt. Wöchentlich wurden Teilwasserwechsel vorgenommen, dazu wurde je Anlage 200 Liter Leitungs- bzw. RO-Wasser in die Pufferspeicher eingeleitet. Über einen Überlauf lief die entsprechende Wassermenge ab, womit auch Verdunstungsverluste ersetzt wurden.

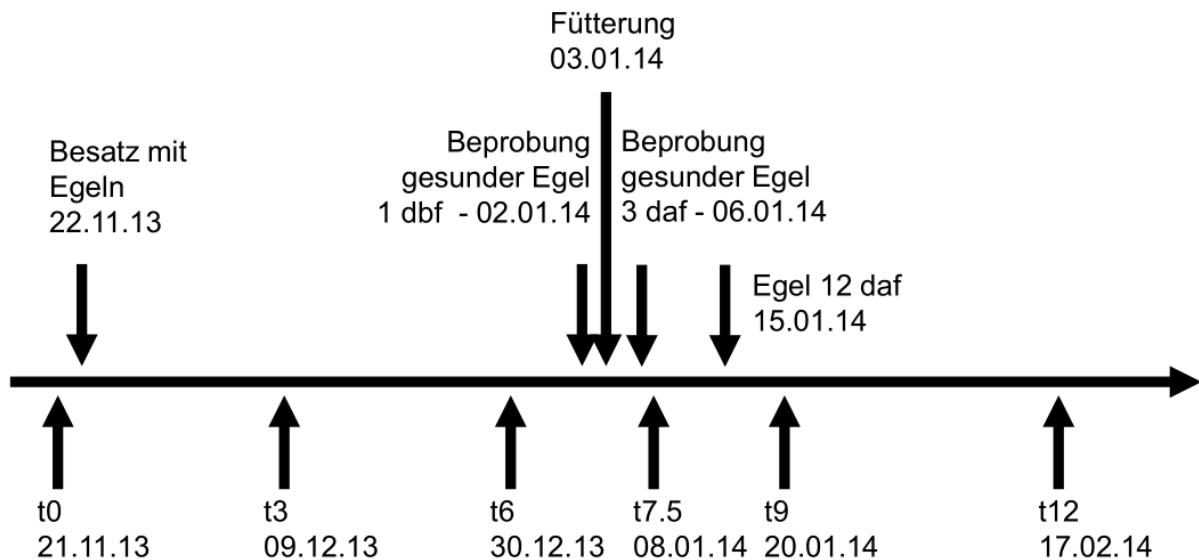


Abbildung 31: Zeitverlauf der Beprobungen während des Fütterungsversuchs 1

$t_x$  bezeichnen Zeitpunkte der Probenahme, Angaben in Wochen; dbf: Anzahl der Tage vor der Blutfütterung; daf: Anzahl der Tage nach der Blutfütterung.

### 3.1.7.2 Ergebnisse Verfahrenstechnik Fütterungsversuch 1

Der Fütterungsversuch 1 zeigte technische Mängel auf, die Großteils im laufenden Betrieb behoben werden konnten. Das Infusionsbesteck zur Dosierung von Eichenextrakt (EE-Anlage) war störanfällig, weil sich der Dosierschlauch an der gequetschten Stelle durch ungelöste Stoffe im Eichenextrakt partiell zusetzte und somit die Dosierung regelmäßig veränderte. Darüber hinaus konnte nur manuell auf Änderungen des pH durch die Ammoniumausscheidungen der Blutegel reagiert werden. Zusammen führte das zu starken Abweichungen von dem gewünschten pH nach oben und unten und somit zu Stress für die Tiere (Abbildung 32). In der Folge reagierten sie apathisch und wollten großteils nicht fressen. Die Blutegel in der RO-Anlage verhielten sich ebenfalls auffällig, verließen teilweise das Wasser oder lagen in unnatürlicher Haltung am Beckenboden. Eine mögliche Erklärung könnten fehlende Mineralien sein, die durch die RO-Anlage herausgefiltert worden waren. Die Aufsalzung mittels Meersalz war vermutlich den Umweltbedingungen der Blutegel nicht adäquat, daher wurde in den Fütterungsversuchen 2 und 3 mit dem gleichen Leitungswasser gearbeitet wie in den anderen Anlagen. Die sonstigen technischen Komponenten arbeiteten problemlos, auch erwies sich das hydraulische Konzept der ständigen Wasserzirkulation als zielführend, da ein Temperatur- und Konzentrationsausgleich stattfand und die Blutegel von der Strömung nicht beeinträchtigt wurden. Die Sauerstoffkonzentration sank nie unter 4,8 mg/l. Stieg im Versuchsverlauf die Konzentration in einem der Aquarien (z.B. Ammonium in Aquarium EEa1) an, wirkte sich dies nicht

unbedingt auf die weiteren beiden Aquarien aus. Dieser Effekt hängt vermutlich mit dem großen Puffervolumen und dem eingeschalteten Filter zusammen.

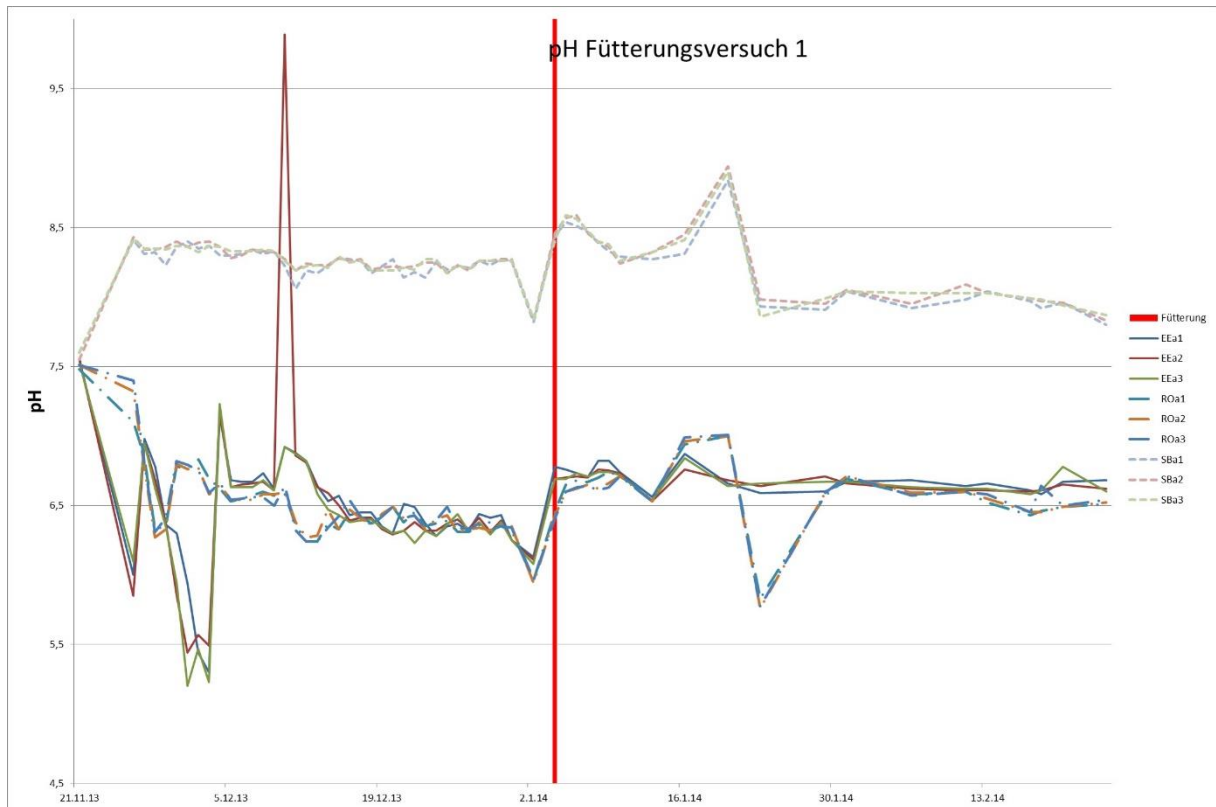


Abbildung 32: Verlauf des pH im Aquarienwasser der drei Anlagen, Fütterungsversuch 1;  
XXax: XX = Anlage, x = Aquarium der jeweiligen Anlage (Triplikate). Senkrechte rote Linie zeigt Fütterungszeitpunkt. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

### 3.1.7.3 Ergebnisse zur chemischen Wasserqualität im Fütterungsversuch 1

Die eingesetzten Filter waren in der Lage, die Stickstoffabbauprodukte Ammonium und Nitrit in Nitrat umzuwandeln. In der EE-Anlage stieg die Ammoniumkonzentration selbst nach der Fütterung kaum an (auf ca. 0,5 mg/l) und fiel rasch wieder auf ein Konzentrationsniveau wie vor der Fütterung. Erst einen Monat nach der Fütterung stieg die Konzentration in einem der Aquarien kurzzeitig auf 1,2 mg/l, vermutlich in Zusammenhang mit Vomieren eines oder mehrerer Bluteigel. Der Anstieg konnte in den anderen beiden Aquarien nicht gemessen werden. In der SB-Anlage stieg die Ammoniumkonzentration in den ersten zehn Tagen nach der Fütterung auf bis zu 4,3 mg/l, um innerhalb weiterer vier Tage auf das Niveau vor der Fütterung abzusinken. Hier fand folglich die schnellste Oxidierung des Ammoniums zu Nitrit statt. Dagegen stieg die  $\text{NH}_4^+$  Konzentration in den Aquarien der RO-Anlage innerhalb der ersten zehn Tage nach der Fütterung auf rd. 7,5 mg/l und benötigte 14 Tage um wieder auf das Niveau vor der Fütterung abzusinken (Abbildung 33).

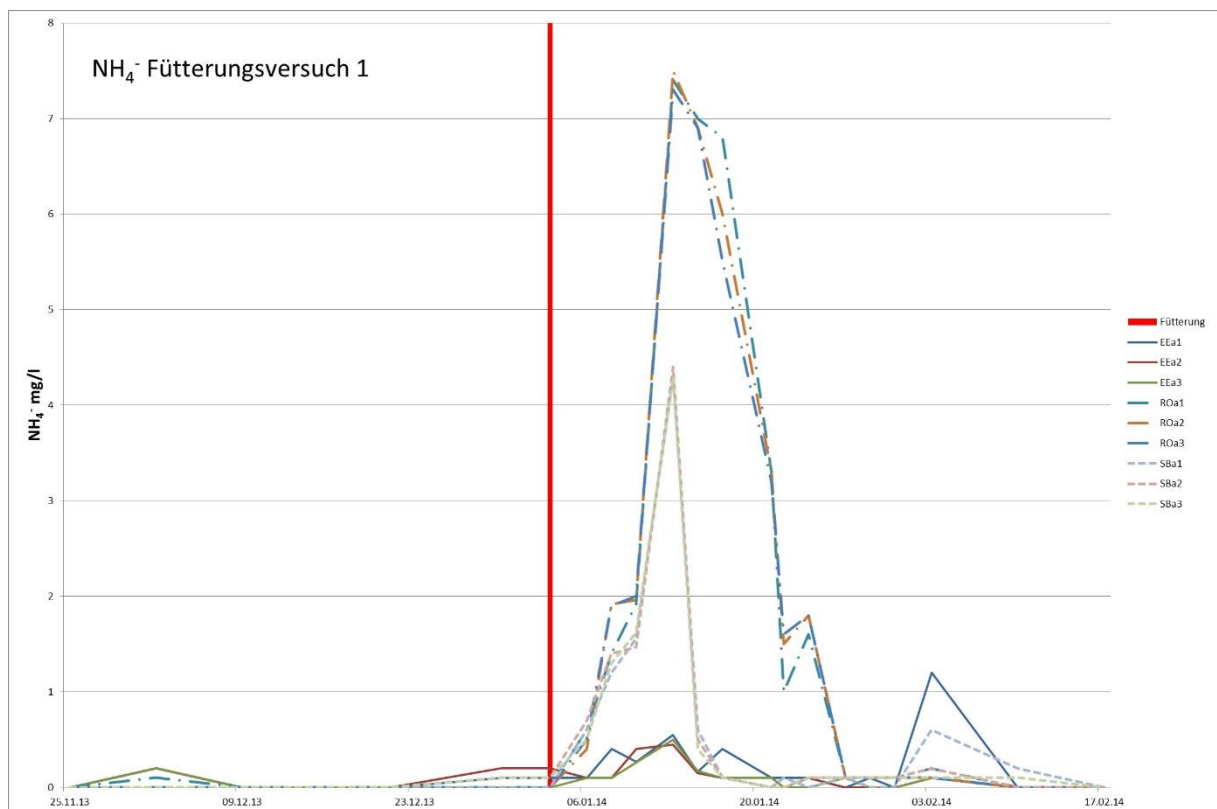


Abbildung 33: Verlauf Ammoniumkonzentration im Aquarienwasser der drei Anlagen, Fütterungsversuch 1; XXax: XX = Anlage, x = Aquarium der jeweiligen Anlage (Triplikate). Senkrechte rote Linie zeigt Fütterungszeitpunkt. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Die Nitritkonzentration in den Aquarien der EE-Anlage stieg nach der Fütterung ebenfalls kaum an. Zwei Wochen nach der Fütterung, ein zweites Mal drei Wochen nach der Fütterung und ein drittes Mal rd. vier Wochen nach der Fütterung stiegen die Nitritkonzentrationen in einzelnen Aquarien kurzzeitig leicht auf maximal 0,4 mg/l an. In der SB-Anlage stieg die Konzentration von Nitrit innerhalb der ersten 12 Tage nach der Fütterung in allen drei Aquarien auf ein Maximum von 2,8 mg/l an, um innerhalb von einer Woche wieder auf ein Niveau, vergleichbar mit dem vor der Fütterung, abzusinken. Vier Wochen nach der Fütterung stieg die Konzentration in einem der Aquarien kurz noch einmal auf 0,5 mg/l an, um dann wieder auf rd. 0,1 mg/l abzufallen. In der SB-Anlage stiegen die Konzentrationen von Nitrit in den drei Aquarien innerhalb einer Woche auf bis zu 1,2 mg/l, fielen innerhalb drei Tagen auf rd. 0,1 mg/l, um innerhalb einer Woche wieder auf ein Maximum von 2,3 mg/l anzusteigen. Nach weiteren drei Tagen war die Konzentration wieder auf ein Niveau wie vor der Fütterung abgefallen (Abbildung 34).

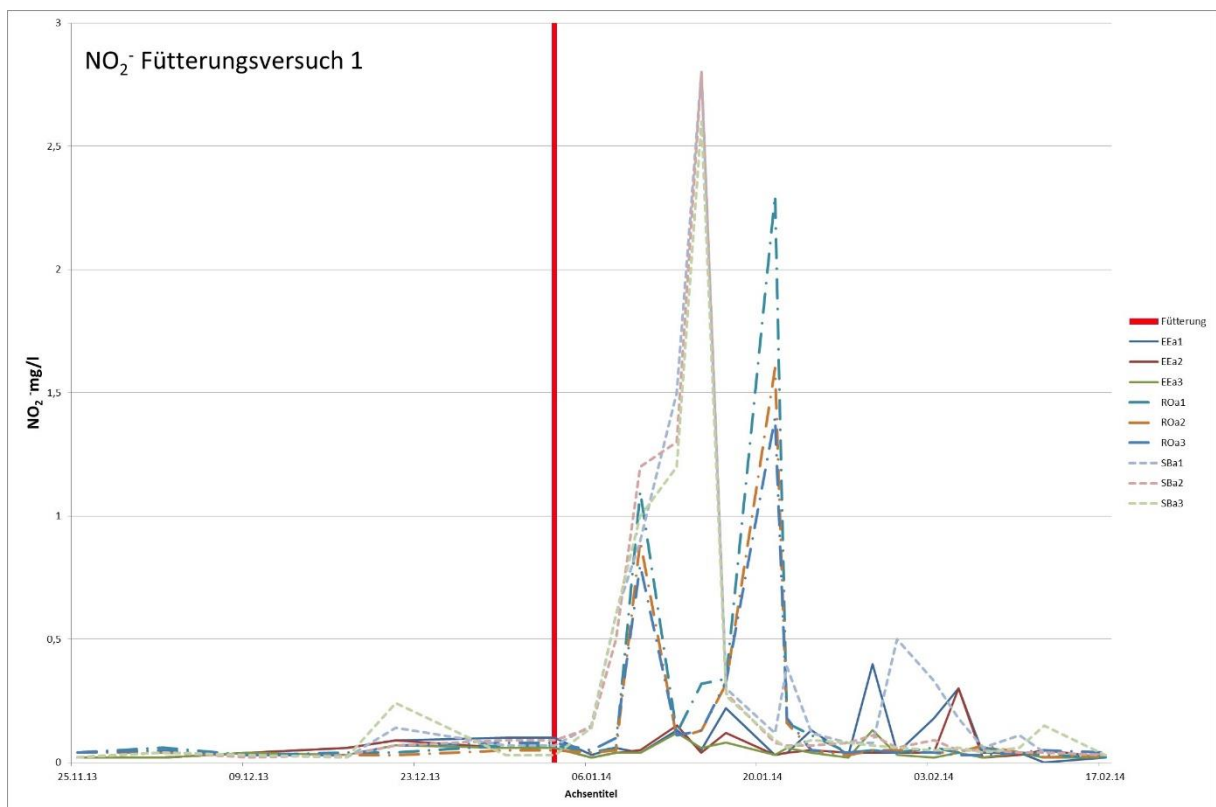


Abbildung 34: Verlauf Nitritkonzentration im Aquarienwasser der drei Anlagen, Fütterungsversuch 1; XXax: XX = Anlage, x = Aquarium der jeweiligen Anlage (Triplikate). EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosroseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Nitrat reicherte sich in den drei Anlagen an und wurde durch die regelmäßigen Wasserwechsel in einem egelverträglichen Rahmen gehalten. Nitrat stieg auch in der Spitze in keinem der Aquarien über 110 mg/l (Abbildung 35). Der pH stieg in der SB-Anlage unmittelbar nach dem Einsetzen der Bluteigel erkennbar an, wurde also vermutlich durch die Ammonium-Ausscheidungen der Bluteigel beeinflusst. Dies macht sich in den geringen Wasservolumen je Tier deutlich bemerkbar (Abbildung 32). In den natürlichen Lebensräumen der Bluteigel wurden vergleichbare pH-Werte gemessen (Tabelle A3).

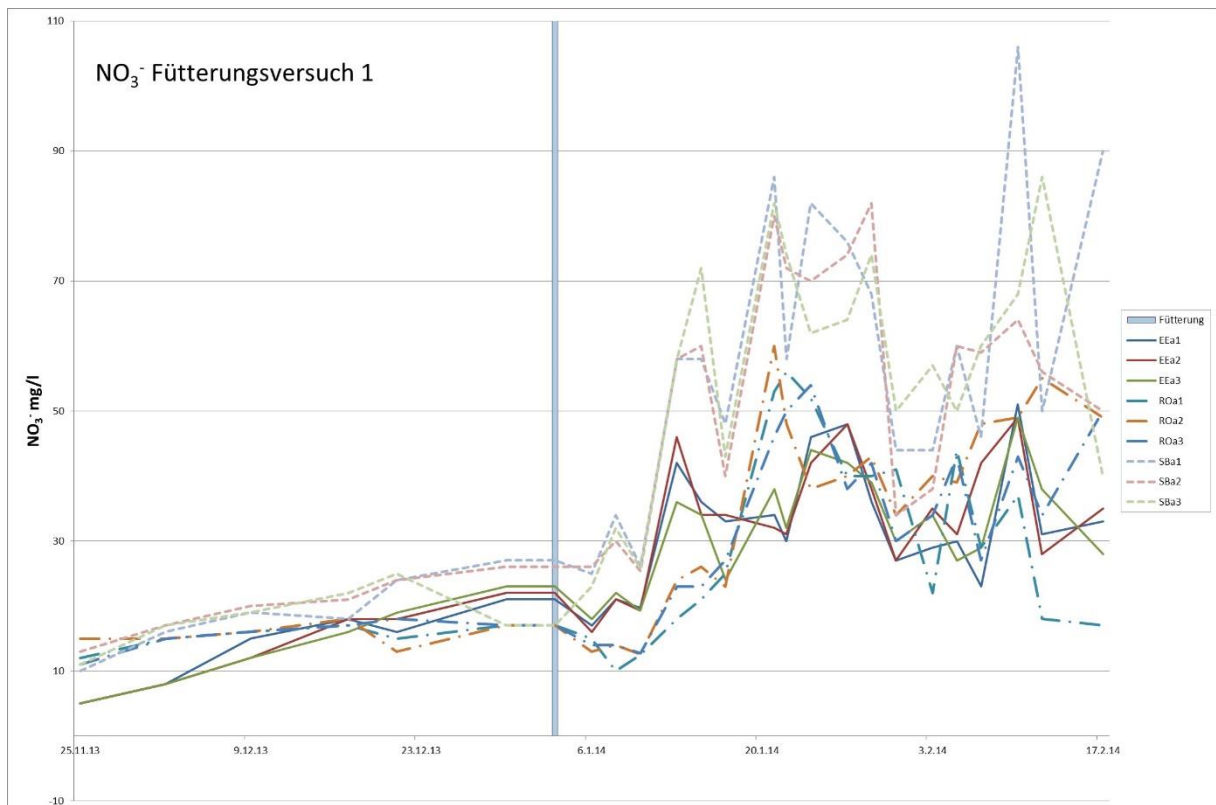


Abbildung 35: Verlauf Nitratkonzentration im Wasser der drei Anlagen, Fütterungsversuch 1; XXax: XX = Anlage, x = Aquarium der jeweiligen Anlage (Triplikate). EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage. Senkrechte blaue Linie zeigt Fütterungszeitpunkt.

### 3.1.7.4 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen Fütterungsversuch 1

Für alle Aquarien wurde die Gesamtzellzahlen der im Wasser vorkommenden Bakterien bestimmt (Tabelle 9; Abbildung 36). Hierbei wurden alle vorliegenden Bakterien, d.h. lebende, tote, aktive und inaktive, kultivierbare und nicht-kultivierbare Bakterien gleichermaßen erfasst. Die Zellzahlen lagen alle im Bereich von  $10^5$  Zellen/ml Wasser. Zu fast allen Probenahmezeitpunkten und in fast allen Versuchsanlagen lagen die Gesamtzellzahlen ein bis zwei Zehnerpotenzen über der Konzentration kultivierbarer Bakterien ( $10^3$  bis  $10^4$  KBE/ml). Die einzige Ausnahme stellte die RO-Anlage zum Zeitpunkt t7,5 dar, dort lag die Konzentration kultivierbarer Bakterien ebenfalls bei  $10^5$  KBE/ml. Die Schwankungen der Konzentration der Gesamtzellzahlen waren deutlich geringer als die der kultivierbaren Bakterien. Die Zellzahlen der SB-Anlage waren immer größer als die der im pH-Wert abgesenkten Anlagen; auch nach der Blutfütterung (Abbildung 36). Generell waren zum Startpunkt der Versuche die Zellzahlen am höchsten und nahmen dann bei allen Anlagen zunächst ab. Bis auf die EE-Anlage zeigten alle Anlagen einen signifikanten Anstieg der Zellzahlen nach der Blutfütterung (t7,5; Abbildung 36). Bei der EE-Anlage wurden auch zu späteren Zeitpunkten keine weiteren signifikanten Änderungen beobachtet.

Tabelle 9: Konzentrationen im Aquarienwasser vorkommender Bakterien (Gesamtzellzahl) bei den drei Versuchsanlagen (EE-, RO- und SB-Anlage) in Fütterungsversuch 1, ermittelt über Gesamtzellzählung fixierter Zellen nach SybrGreen I Färbung. Gezeigt ist die Konzentration an Bakterienzellen/ml Wasserprobe je Probenahmezeitpunkt. Dargestellt sind die Mittelwerte der drei parallel geschalteten Aquarien mit Standardabweichungen, die durch Fehlerfortpflanzung aus den Einzelwerten für jedes Aquarium berechnet wurden (basierend auf 10 Einzelzählungen pro Becken). tx: Probenahmezeitpunkte in Wochen. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Zeitpunkt	EE-Anlage	RO-Anlage	SB-Anlage
t	$5,4 (\pm 1,5) 10^5$	$5,0 (\pm 1,1) 10^5$	$6,1 (\pm 1,7) 10^5$
t3	$3,4 (\pm 1,0) 10^5$	$3,2 (\pm 0,9) 10^5$	$4,9 (\pm 1,7) 10^5$
t6	$1,0 (\pm 0,4) 10^5$	$1,0 (\pm 0,3) 10^5$	$2,4 (\pm 0,7) 10^5$
t7,5	$1,5 (\pm 0,7) 10^5$	$5,0 (\pm 2,0) 10^5$	$6,4 (\pm 1,5) 10^5$
t9	$9,3 (\pm 0,4) 10^4$	$1,3 (\pm 0,6) 10^5$	$3,6 (\pm 0,7) 10^5$
t12	$1,4 (\pm 0,5) 10^5$	$1,4 (\pm 0,6) 10^5$	$4,0 (\pm 0,7) 10^5$

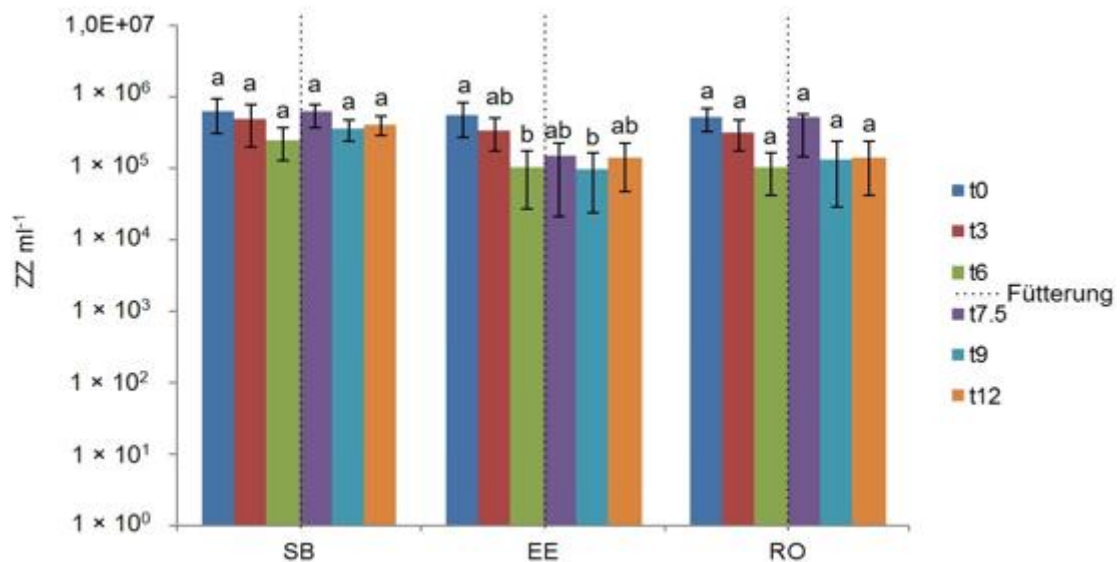


Abbildung 36: Konzentrationen im Aquarienwasser vorkommender Bakterien (Gesamtzellzahl) der drei Versuchsanlagensysteme Fütterungsversuch 1 (Angabe in Zellzahlen/ml Wasser). Dargestellt i. F. eines Balkendiagramms mit statistischem Vergleich zwischen den Probenahmezeitpunkten je Anlage (ANOVA-Analyse mit Tukey Test, durchgeführt in SigmaPlot). Unterschiedliche Zahlen zeigen jeweils statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ). Gezeigt wird die Konzentration der Gesamtbakterien/ml Wasserprobe in logarithmischer Darstellung zu den Probenahmezeitpunkten in den Anlagen. Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren die drei parallel geschalteten Aquarien. Je Aquarium wurden Mittelwerte und Standardabweichungen aus 10 gezählten mikroskopischen Bildern berechnet. Die davon resultierenden Standardabweichungen gingen über Fehlerfortpflanzung in die angegebenen Werte mit ein. tx: Probenahmezeitpunkte angegeben in Wochen. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Die Konzentration auf DEV kultivierbarer Bakterien des Aquarienwassers lag zwischen  $10^3$  und  $10^5$  KBE/ml Wasser (Tabelle 10, Abbildung 37). Die Konzentrationen in der SB-Anlage waren generell bis zu einer Zehnerpotenz höher als bei den Anlagen mit abgesenkten pH-Werten. Die einzige Ausnahme stellte der Zeitpunkt nach der Blutfütterung dar (t7,5). Hier kam es bei beiden Anlagen mit herabgesetzten pH-Werten zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration auf DEV kultivierbarer Bakterien, von  $10^3$  auf  $10^4$  KBE/ml bei der EE-Anlage und von  $10^3$  auf  $10^5$  KBE/ml bei der RO-Anlage. Die Konzentrationen lagen somit deutlich über der SB-Anlage. Nach der Blutfütterung (t7,5) zeigte sich auch bei der SB-Anlage ein signifikanter Anstieg der Konzentration kultivierbarer Bakterien. Die Konzentration lag hier im gleichen Bereich wie in der EE-Anlage, bei  $10^4$  KBE/ml. Entgegen den Anlagen mit abgesenkten pH-Werten nahm die Konzentration nicht wieder ab (keine signifikanten Änderungen zwischen t7,5 und t12; Abbildung 37). Eine erste Betrachtung der Koloniemorphologietypen der kultivierbaren Bakterien zeigte deutliche Unterschiede in der Abundanz verschiedener Bakterien in

den Anlagen. Die abundantesten Kolonien wurden vereinzelt und die Reinkulturen über molekulare Fingerprintanalyse vergleichend untersucht und über 16S rRNA Gensequenzierung phylogenetisch bestimmt.

Tabelle 10: Konzentration auf DEV, R2A und EMB kultivierter wasserassoziierter Bakterien in den Anlagen Fütterungsversuch 1. Konzentration kultivierbarer Bakterien angegeben in Koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml Wasser je Probenahmezeitpunkt. Dargestellt sind die Mittelwerte für die jeweils drei parallel geschalteten Aquarien mit entsprechenden Standardabweichungen, die durch Fehlerfortpflanzung aus den Einzelwerten für jedes Aquarium berechnet wurden. tx: Probenahmezeitpunkte angegeben in Wochen. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

DEV	t0	t3	t6	t7,5	t9	t12
EE-Anlage	3,1 ( $\pm 1,4$ )x10 <sup>2</sup>	2,5 ( $\pm 0,8$ )x10 <sup>2</sup>	4,0 ( $\pm 1,9$ )x10 <sup>4</sup>	2,8 ( $\pm 0,8$ )x10 <sup>4</sup>	4,6 ( $\pm 2,3$ )x10 <sup>2</sup>	2,2 ( $\pm 1,1$ )x10 <sup>4</sup>
RO-Anlage	2,7 ( $\pm 0,3$ )x10 <sup>2</sup>	1,7 ( $\pm 0,4$ )x10 <sup>2</sup>	2,4 ( $\pm 1,0$ )x10 <sup>4</sup>	2,5 ( $\pm 0,4$ )x10 <sup>5</sup>	5,0 ( $\pm 0,9$ )x10 <sup>2</sup>	3,7 ( $\pm 1,7$ )x10 <sup>2</sup>
SB-Anlage	5,8 ( $\pm 1,9$ )x10 <sup>4</sup>	7,0 ( $\pm 1,0$ )x10 <sup>2</sup>	6,9 ( $\pm 0,6$ )x10 <sup>2</sup>	3,9 ( $\pm 0,7$ )x10 <sup>4</sup>	1,7 ( $\pm 0,7$ )x10 <sup>4</sup>	3,2 ( $\pm 0,5$ )x10 <sup>4</sup>
R2A	t0	t3	t6	t7,5	t9	t12
EE-Anlage	1,9 ( $\pm 2,4$ )x10 <sup>4</sup>	6,2 ( $\pm 1,1$ )x10 <sup>2</sup>	9,7 ( $\pm 2,9$ )x10 <sup>2</sup>	2,9 ( $\pm 0,7$ )x10 <sup>4</sup>	1,0 ( $\pm 0,2$ )x10 <sup>4</sup>	4,9 ( $\pm 1,1$ )x10 <sup>2</sup>
RO-Anlage	9,5 ( $\pm 1,1$ )x10 <sup>4</sup>	1,1 ( $\pm 0,4$ )x10 <sup>4</sup>	8,1 ( $\pm 4,6$ )x10 <sup>2</sup>	2,6 ( $\pm 0,4$ )x10 <sup>5</sup>	9,6 ( $\pm 1,2$ )x10 <sup>2</sup>	5,2 ( $\pm 1,2$ )x10 <sup>2</sup>
SB-Anlage	5,1 ( $\pm 1,6$ )x10 <sup>4</sup>	1,1 ( $\pm 0,1$ )x10 <sup>4</sup>	7,2 ( $\pm 1,2$ )x10 <sup>2</sup>	4,2 ( $\pm 0,7$ )x10 <sup>4</sup>	1,8 ( $\pm 1,0$ )x10 <sup>4</sup>	2,8 ( $\pm 0,5$ )x10 <sup>4</sup>
EMB	t0	t3	t6	t7,5	t9	t12
EE-Anlage	2,3 ( $\pm 1,2$ )x10 <sup>4</sup>	4,3 ( $\pm 2,0$ )x10 <sup>2</sup>	3,3 ( $\pm 0,9$ )x10 <sup>2</sup>	1,8 ( $\pm 0,4$ )x10 <sup>4</sup>	3,2 ( $\pm 1,1$ )x10 <sup>2</sup>	2,0 ( $\pm 0,4$ )x10 <sup>2</sup>
RO-Anlage	2,3 ( $\pm 1,1$ )x10 <sup>2</sup>	2,1 ( $\pm 1,8$ )x10 <sup>2</sup>	1,5 ( $\pm 1,3$ )x10 <sup>2</sup>	2,4 ( $\pm 0,7$ )x10 <sup>5</sup>	3,3 ( $\pm 2,1$ )x10 <sup>2</sup>	3,3 ( $\pm 0,6$ )x10 <sup>2</sup>
SB-Anlage	1,4 ( $\pm 0,1$ )x10 <sup>4</sup>	2,6 ( $\pm 0,8$ )x10 <sup>2</sup>	2,1 ( $\pm 0,3$ )x10 <sup>2</sup>	1,6 ( $\pm 0,2$ )x10 <sup>4</sup>	9,0 ( $\pm 3,4$ )x10 <sup>2</sup>	3,4 ( $\pm 1,9$ )x10 <sup>2</sup>

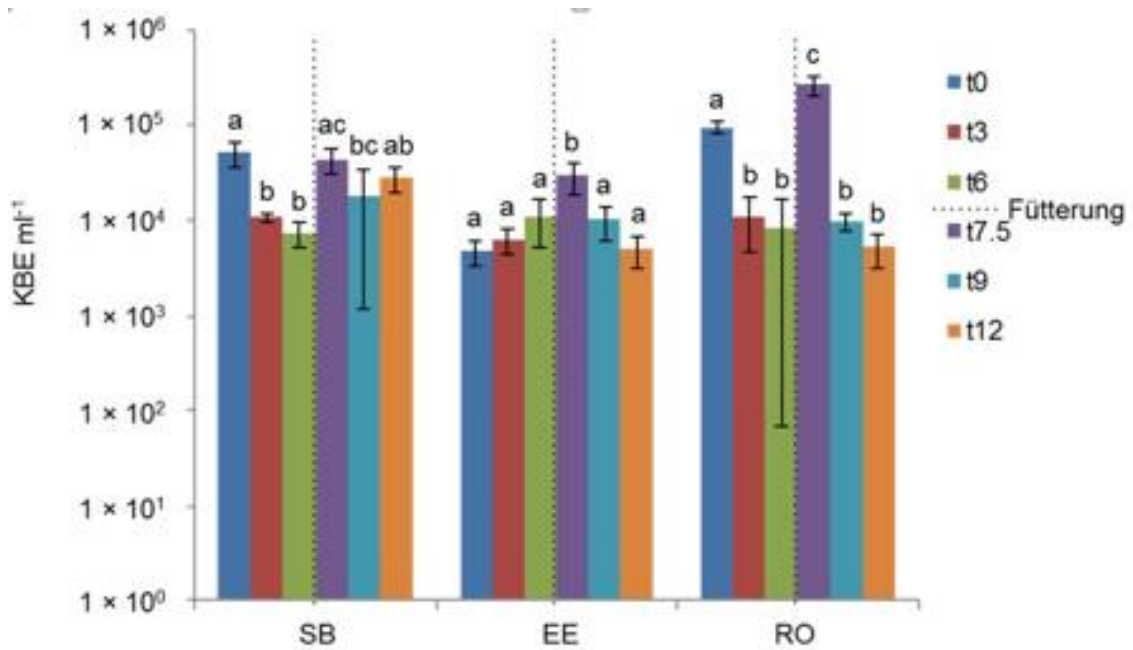


Abbildung 37: Konzentration auf DEV kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (Koloniebildende Einheiten KBE/ml Wasser) der drei Versuchsanlagesysteme Fütterungsversuch 1. Dargestellt i. F. eines Balkendiagramms mit statistischer Auswertung (ANOVA-Analyse mit Tukey Test durchgeführt in SigmaPlot; unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ ). Versuchsanlagen: EE-, RO- und SB-Anlage. Gezeigt sind Konzentrationen kultivierbarer Bakterien als Kolonie Bildende Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe in logarithmischer Darstellung je Probenahmezeitpunkt und Anlage. Dargestellt sind die Mittelwerte für die jeweils drei parallel geschalteten Aquarien mit entsprechenden Standardabweichungen. Die Unterschiede, die sich zwischen den dreifachen Ausplattierungen je Aquarium Probe ergaben, wurden durch Fehlerfortpflanzung berücksichtigt. tx: Probenahmezeitpunkte angegeben in Wochen. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Die Konzentration auf R2A kultivierter Bakterien des Aquarienwassers lag zwischen  $10^3$  und  $10^5$  KBE/ml Wasser und damit im selben Konzentrationsbereich wie bei DEV ( $10^3$  bis  $10^5$  KBE/ml). Die Konzentration in der SB-Anlage war auch hier generell bis zu einer Zehnerpotenz höher als bei den Anlagen mit abgesenkten pH-Werten. Die einzige Ausnahme stellte die Beprobung nach der Blutfütterung dar (t7,5). Hier kam es bei der RO-Anlage (herabgesetzter pH) zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration kultivierbarer Bakterien von  $10^3$  auf  $10^5$  KBE/ml. Die Konzentration in der EE-Anlage stieg dagegen nach der Blutfütterung nicht signifikant an. Nach der Blutfütterung (t7,5) zeigte sich auch bei der SB-Anlage ein signifikanter Anstieg der Konzentration kultivierbarer Bakterien. Die Konzentration lag hier im gleichen Bereich wie bei der EE-Anlage, bei  $10^4$  KBE/ml. Nach der Blutfütterung nahm die Konzentration wieder ab (signifikante Änderungen zwischen t7,5 und t9; Abbildung 38) und stieg ab Zeitpunkt t9 wieder an. Hier wurden ebenfalls die abundantesten Kolonien vereinzelt (Tabelle 10).

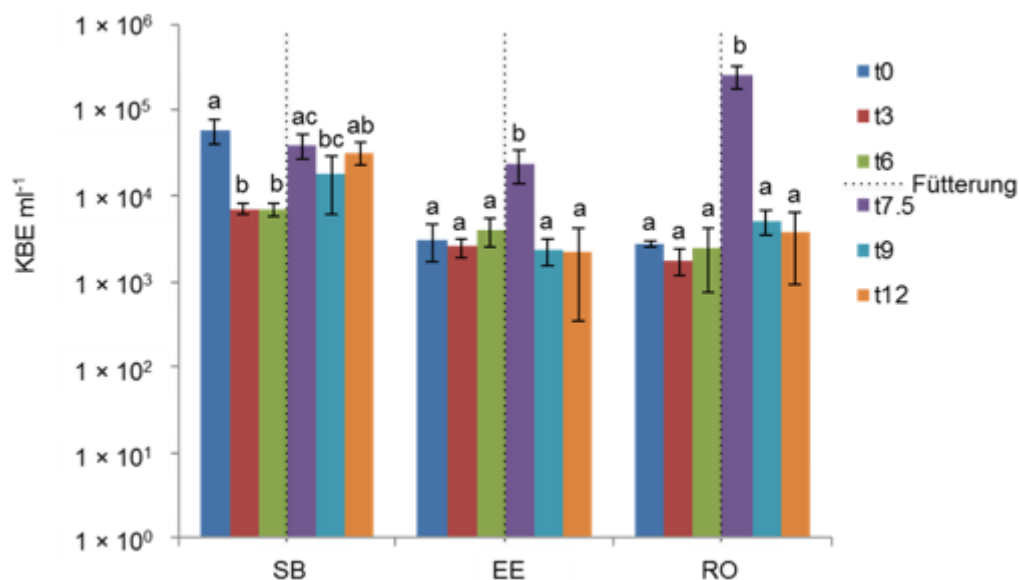


Abbildung 38: Konzentration auf R2A kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (Koloniebildende Einheiten KBE/ml Wasser) der drei Versuchsanlagesysteme Fütterungsversuch 1. Dargestellt i. F. eines Balkendiagramms mit statistischer Auswertung (ANOVA-Analyse mit Tukey Test durchgeführt in SigmaPlot; unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ ). Weitere Angaben siehe Abbildung 37. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Die Konzentration auf EMB kultivierter Bakterien des Aquarienwassers lag zwischen  $10^3$  und  $10^5$  KBE/ml (Abbildung 39) und somit im selben Konzentrationsbereich wie bei DEV und R2A. Die Konzentration in der SB-Anlage war auch hier generell bis zu einer Zehnerpotenz höher als bei den Anlagen mit abgesenktem pH. Die einzige Ausnahme stellte die Beprobung nach der Blutfütterung dar (t7,5). Hier kam es bei beiden Anlagen mit herabgesetztem pH zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration kultivierbarer Bakterien: von  $10^3$  auf  $10^5$  KBE/ml bei der RO-Anlage und von  $10^3$  auf  $10^4$  KBE/ml bei der EE-Anlage. Nach der Blutfütterung (t7,5) zeigte sich auch bei der SB-Anlage ein signifikanter Anstieg der Konzentration kultivierbarer Bakterien. Die Konzentration lag hier mit  $10^4$  KBE/ml im gleichen Bereich wie bei der EE-Anlage. Nach der Blutfütterung nahm die Konzentration signifikant ab (signifikante Änderungen zwischen t7,5, t9 und t12; Abbildung 39). EMB-Agar wurde eingesetzt um die Abundanz von *Enterobacteriaceae*, v. a. coliformer Vertreter, zu untersuchen. Coliforme Bakterien (v. a. *E. coli*) sollten durch dunkel pigmentierte Kolonien, bei *E. coli* zusätzlich metallisch glänzende Kolonien detektierbar sein; dies war hier jedoch schwierig zu erfassen. Erschwert wurde dies v.a. durch stark-schleimige Kolonien in verschiedenen rosa Pigmentierungsabstufungen (Tabelle 10, Abbildung 39).

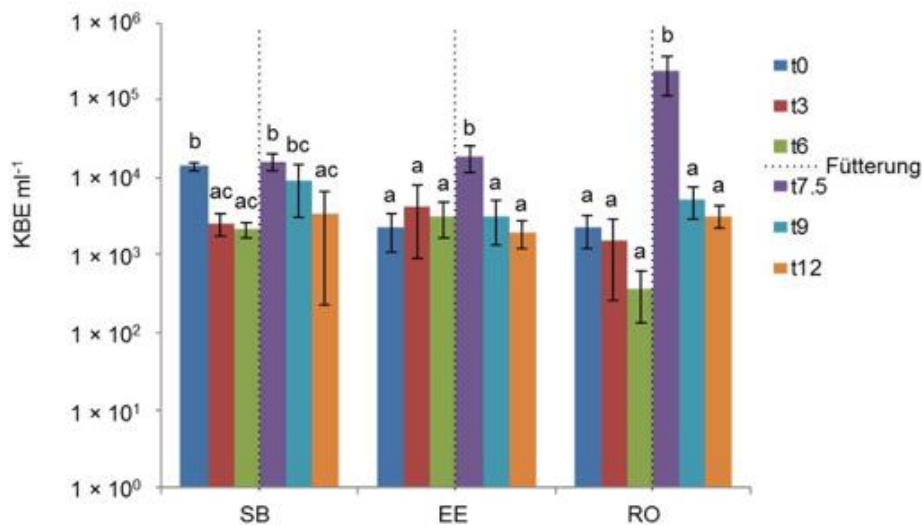


Abbildung 39: Konzentration auf EMB-Agar kultivierbarer Bakterien aus den Wasserproben (Koloniebildende Einheiten KBE/ml Wasser) der drei Versuchsanlagensysteme Fütterungsversuch 1. Dargestellt i. F. eines Balkendiagramms mit statistischer Auswertung (ANOVA-Analyse mit Tukey Test durchgeführt in SigmaPlot; unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ ). Weitere Angaben siehe Abbildung 37. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Insgesamt wurden 180 Kolonien der am höchsten bewachsenen Verdünnungsstufen in Reinkultur gebracht und die Isolate phylogenetisch identifiziert (DEV: 97, R2A: 55; EMB: 28 Isolate). Die Isolate wurden über partielle 16S rRNA Gensequenzierung (ca. 1.600 nt) phylogenetisch identifiziert. Hierzu wurden die Isolate über eine BLAST-Analyse in der EzTaxon Typstammdatenbank (Kim, et al., 2012) auf Gattungsebene zugeordnet. Die Isolate wurden vier Phyla zugeordnet, den *Actinobacteria* (56 Isolate), *Bacteroidetes* (62 Isolate), *Firmicutes* (1 Isolat) und *Proteobacteria* (138 Isolate) (*Alpha*-, *Beta*- und *Gamma*proteobacteria) (Abbildung 40).

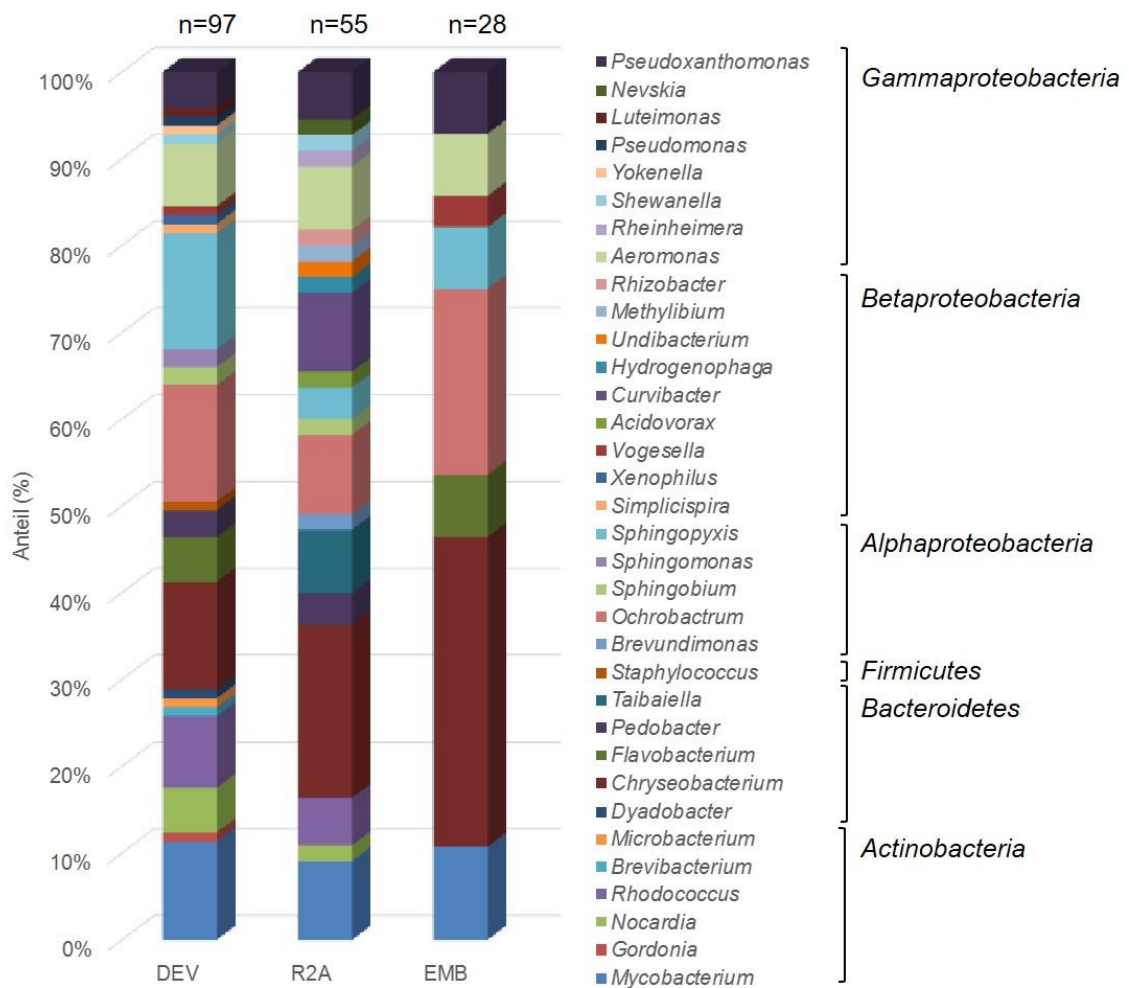


Abbildung 40: Abundanz der auf DEV, R2A und EMB kultivierten Bakterien aus den Aquarienwasserproben der EE-, RO- und SB-Anlagen, Fütterungsversuch 1. Vergleich der Abundanz detektierter Familien bei der Kultivierung auf verschiedenen Medien. Insgesamt wurden 180 Isolate analysiert. (n = x: Anzahl Isolate).

Aus der Kultivierung auf DEV wurden 97 Isolate gewonnen, die 24 verschiedenen Gattungen zugeordnet werden konnten (Abbildung 41). Davon waren fünf Gattungen in allen Anlagen zu finden (*Mycobacterium*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Ochrobactrum* und *Sphingopyxis*). Isolate, die den Gattungen *Gordonia*, *Dyadobacter*, *Brevundimonas*, *Shewanella* und *Xenophilus* zugeordnet wurden, wurden ausschließlich vor der Blutfütterung isoliert. Dagegen wurden Isolate, die den Gattungen *Staphylococcus*, *Sphingomonas*, *Simplicispira*, *Vogesella*, *Yokenella* und *Morganella* zugeordnet wurden, nur nach der Blutfütterung detektiert. Die Gattungen *Microbacterium*, *Dyadobacter*, *Staphylococcus*, *Vogesella*, *Yokenella* und *Luteimonas* wurden nur aus der EE-Anlage isoliert und die Gattungen *Brevibacterium*, *Sphingomonas*, *Simplicispira*, *Xenophilus* und *Shewanella* nur aus der RO-Anlage. Die häufigsten Gattungen (mit mehr als drei Nachweisen) waren *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Taibaiella*, *Ochrobactrum*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Curvibacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* und *Pseudoxanthomonas*. Die restlichen Gattungen waren nur mit ein bis drei Isolaten vertreten und somit nur Einzelnachweise. Besonders viele dieser weniger abundanten Gattungen konnten nur auf R2A isoliert werden (zehn Gattungen).

Phylum	Familie	Gattung	DEV															Anzahl der gepikten Isolate							
			SB					EE					RO												
			t0	t3	t6	t7.5	t9	t12	t0	t3	t6	t7.5	t9	t12	t0	t3	t6		t7.5	t9	t12				
Actinobacteria	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>		1	2				1		1	2				1		1	1				1	11	
		<i>Nocardia</i>												1											1
	Nocardiaceae	<i>Gordonia</i>																							5
		<i>Nocardia</i>		1	2														1	1					8
		<i>Rhodococcus</i>									1							1	2	2				2	1
Bacteroidetes	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>																	1					1	
		<i>Microbacterium</i>												1											1
	Cytophagaceae	<i>Dyadobacter</i>											1												1
		<i>Chryseobacterium</i>											1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	12
		<i>Flavobacterium</i>	1														1	1				1			5
Firmicutes	Sphingobacteriaceae	<i>Pedobacter</i>													1								1	3	
		<i>Staphylococcus</i>																						1	1
	Alphaproteobacteria	<i>Brucellaceae</i>																							13
		<i>Sphingomonadaceae</i>																							2
		<i>Sphingobium</i>																							2
Betaproteobacteria	Comamonadaceae	<i>Sphingomonas</i>																						13	
		<i>Sphingopyxis</i>																							1
		<i>Simplicispira</i>																							1
	Neisseriaceae	<i>Xenophilus</i>																							1
		<i>Vogesella</i>																							1
Gammaproteobacteria	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>																						7	
		<i>Shewanella</i>																							1
	Enterobacteriaceae	<i>Yokenella</i>																							1
		<i>Pseudomonas</i>																							1
		<i>Luteimonas</i>																							1
Xanthomonadaceae	<i>Pseudoxanthomonas</i>																						4		
																								97	

Abbildung 41: Auftreten abundanter, auf DEV kultivierter Bakterien aus Aquarienwasserproben zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten und in den Anlagen Fütterungsversuch 1. Anzahl analysierter Isolate: EE: 36, RO: 39, SB: 29. Die Zuordnung erfolgte über eine BLAST-Analyse in der Typstammdatenbank EzTaxon (Kim et al. 2012). EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosioseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Die insgesamt 97 Isolate repräsentierten 63 verschiedene „Phylotypen“ (definiert durch unterschiedliche 16S rRNA Gensequenzen) und 99 verschiedene „Genotypen“ (definiert durch genomische Fingerprintanalyse, verschiedene BOX-Fingerprint Muster (Glaeser et al. 2013).

Aus der Kultivierung auf R2A wurden 55 Isolate gewonnen, die 21 verschiedenen Gattungen zugeordnet wurden (Abbildung 42). Davon waren drei Gattungen in allen Anlagen zu finden (*Mycobacterium*, *Chryseobacterium* und *Ochrobactrum*). Nur die Gattungen *Rhodococcus*, *Acidovorax*, *Massilia* und *Nevskia* konnten ausschließlich vor der Blutfütterung isoliert werden. Dagegen wurden Isolate, die den Gattungen *Taibaiella*, *Brevundimonas*, *Bosea*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Blastomonas*, *Undibacterium*, *Piscinibacter*, *Rhizobacter*, *Aeromonas*, *Rheinheimera*, *Shewanella*, *Pseudomonas* und *Pseudoxanthomonas* zugeordnet wurden, nur nach der Blutfütterung nachgewiesen. Die Gattungen *Brevundimonas*, *Sphingobium* und *Rheinheimera* traten ausschließlich in der SB-Anlage auf. Die Gattungen *Taibaiella*, *Acidovorax*, *Undibac-*



Phylum	Familie	Gattung	EMB																		Anzahl der gepikten Isolate				
			SB						EE						RO										
			t0	t3	t6	t7.5	t9	t12	t0	t3	t6	t7.5	t9	t12	t0	t3	t6	t7.5	t9	t12					
Actinobacteria	[ Mycobacteriaceae	Mycobacterium			1				1			1	1	1	1	1									3
Bacteroidetes	[ Flavobacteriaceae	Chryseobacterium Flavobacterium				1	1					1	1	1	1	1					1	1	1		10
Alphaproteobacteria	[ Brucellaceae	Ochrobactrum Sphingopyxis			1								1	2						1		1		6	
Betaproteobacteria	[ Neisseriaceae	Vogesella				1	1																	2	
Gammaaproteobacteria	[ Aeromonadaceae	Aeromonas												1										1	
	[ Xanthomonadaceae	Pseudoxanthomonas	1																		1			2	
						1	1																	2	
																								28	

Abbildung 43: Auftreten abundanter, auf EMB kultivierter Bakterien aus Aquarienwasserproben zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten und in den Anlagen Fütterungsversuch 1. Anzahl analysierter Isolate: EE: 11, RO: 7, SB: 10. Die Zuordnung erfolgte über BLAST-Analyse in der Typstammdatenbank EzTaxon (Kim et al. 2012). EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Für einzelne abundant-auftretende Koloniemorphologietypen wurde eine genauere Analyse der Abundanzverschiebung in einzelnen Anlagen über die Zeit durchgeführt, v. a. solche Bakterien wurden betrachtet, deren Auftreten sich in Abhängigkeit zu der Blutfütterung verschob. Die Kolonien wurden über die Identifikation repräsentativer Kolonien mit Hilfe der molekularen Fingerprintanalyse und 16S rRNA Gen-Sequenzierung der gewonnenen Isolate identifiziert. Die Analyse wurde nur für die Kultivierung auf DEV betrachtet. Zuerst wurde die Abundanzverschiebung von *Chryseobacterium* spp. genauer betrachtet. *Chryseobacterium* spp. werden als Ubiquisten vor allem in Wasser und Erde gefunden, sind regelmäßig für nosokomiale Infektionen verantwortlich und spielen in der Aquakultur als Pathogene ebenfalls eine Rolle (Kirby et al. 2004; Zamora et al. 2012). In der SB-Anlage waren die *Chryseobacterium* Kolonien zu Beginn des Versuches nicht nachweisbar. Erst 1,5 Wochen nach der Blutfütterung traten diese in höchster Konzentration im Bereich von  $10^3$  KBE/ml Wasser auf. Bis zum Ende des Versuches sank die Konzentration ab. In der EE-Anlage traten sie erst drei Wochen nach Versuchsbeginn auf und stiegen innerhalb 1,5 Wochen nach der Fütterung auf eine Konzentration im Bereich von  $10^4$  KBE/ml Wasser, um anschließend bis zum Ende des Versuches wieder leicht zu sinken. In der RO-Anlage waren *Chryseobacterium*-Kolonien über den gesamten Versuch hinweg nur in geringer Konzentration nachweisbar ( $10^1$  KBE/ml Wasser). Eineinhalb Wochen nach der Blutfütterung stieg die Konzentration stark an ( $10^5$  KBE/ml Wasser), danach sank die Abundanz direkt wieder in einen Konzentrationsbereich von  $10^2$  KBE/ml Wasser.

Neben den *Chryseobacterium* spp. wurde das Auftreten von *Flavobacterium* spp. genauer betrachtet (Tabelle 11, Abbildung 44). In der EE-Anlage zeigte sich ein leichter Anstieg an *Flavobacterium* spp. über die ersten drei Wochen des Versuches. Ab der dritten Woche nahm

die Konzentration ab, bis sie 1,5 Wochen nach der Fütterung nicht mehr nachweisbar waren. Bei den letzten beiden analysierten Zeitpunkten konnten die *Flavobacterium* spp. nicht mehr nachgewiesen werden. In der RO-Anlage konnten zu Beginn keine *Flavobacterium* Kolonien nachgewiesen werden, drei Wochen später war eine geringere Konzentration nachweisbar. Später konnten sie erst wieder drei Wochen nach der Blutfütterung nachgewiesen werden, sie erreichten eine Konzentration im Bereich von  $10^2$  KBE/ml Wasser. Bis zu der 12. Woche (t12) nahm die Abundanz wieder leicht ab. Somit verschwanden sie in beiden sauren Anlagen direkt nach der Fütterung, um in der RO-Anlage nach der Fütterung anzusteigen und in der EE-Anlage vollständig zu verschwinden. In der SB-Anlage waren die *Flavobacterium* Kolonien zu Beginn des Versuches in geringer Abundanz bis zur dritten Versuchswoche vorhanden und verschwanden anschließend bis 1,5 Wochen nach der Blutfütterung. Dort waren sie mit einer Konzentration im Bereich von  $10^3$  KBE/ml Wasser nachweisbar, danach waren sie nicht mehr nachweisbar. In der SB-Anlage stieg die Konzentration nur leicht an (Tabelle 11, Abbildung 44). *Flavobacterium* spp. spielen in aquatischen Systemen eine Rolle beim Abbau organischer Substanz, sind in der Aquakultur auch als fischpathogen bekannt, insbesondere Kiemenkrankheiten können von ihnen ausgelöst werden (Touchon et al. 2011).

Zusätzlich zu *Chryseobacterium* spp. und *Flavobacterium* spp. wurde das Auftreten als *Pseudomonas* spp. identifizierter Kolonien genauer betrachtet. Diese waren vor der Blutfütterung nicht nachweisbar und direkt nach der Blutfütterung mit einer Konzentration von  $10^3$  KBE/ml Wasser vorhanden. In den weiteren Wochen nahm die Abundanz wieder deutlich ab. Zur letzten Probenahme in Woche 12 (t12) waren sie nicht mehr nachweisbar.

Tabelle 11: Konzentration auf DEV kultivierter *Chryseobacterium* spp. und *Flavobacterium* spp. aus den Wasserproben der EE-, RO-, SB-Anlagen, Fütterungsversuch 1. Gezeigt sind die Konzentration kultivierbarer Bakterien in Koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe je Probenahmezeitpunkt. Dargestellt sind die Mittelwerte für die jeweils drei parallel geschalteten Aquarien mit Standardabweichungen, die durch Fehlerfortpflanzung aus den Einzelwerten für jedes Aquarium berechnet wurde. tx: Probenahmezeitpunkte, angegeben in Wochen.  
EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

<i>Chryseobacterium</i> spp.	EE-Anlage	RO-Anlage	SB-Anlage
t0	0,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^0$	1,0 ( $\pm 0,6$ ) $\times 10^1$	0,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^0$
t3	2,4 ( $\pm 4,5$ ) $\times 10^2$	5,3 ( $\pm 5,6$ ) $\times 10^1$	0,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^0$
t6	2,9 ( $\pm 2,6$ ) $\times 10^2$	5,1 ( $\pm 3,0$ ) $\times 10^1$	1,1 ( $\pm 5,8$ ) $\times 10^0$
t7,5	1,9 ( $\pm 1,4$ ) $\times 10^4$	2,0 ( $\pm 0,7$ ) $\times 10^5$	1,2 ( $\pm 2,7$ ) $\times 10^3$
t9	0,9 ( $\pm 1,4$ ) $\times 10^3$	8,9 ( $\pm 2,4$ ) $\times 10^2$	3,9 ( $\pm 6,0$ ) $\times 10^2$
t12	1,9 ( $\pm 1,5$ ) $\times 10^2$	0,5 ( $\pm 1,4$ ) $\times 10^3$	4,0 ( $\pm 3,1$ ) $\times 10^2$
<i>Flavobacterium</i> spp.	EE-Anlage	RO-Anlage	SB-Anlage
t0	2,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^2$	0,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^0$	2,2 ( $\pm 3,8$ ) $\times 10^0$
t3	6,3 ( $\pm 2,8$ ) $\times 10^2$	1,6 ( $\pm 3,3$ ) $\times 10^1$	3,3 ( $\pm 5,8$ ) $\times 10^0$
t6	2,8 ( $\pm 1,9$ ) $\times 10^2$	0,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^0$	0,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^0$
t7,5	0,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^0$	0,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^0$	2,7 ( $\pm 2,8$ ) $\times 10^3$
t9	0,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^0$	6,3 ( $\pm 2,8$ ) $\times 10^2$	0,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^0$
t12	0,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^0$	0,6 ( $\pm 1,5$ ) $\times 10^2$	0,0 ( $\pm 0,0$ ) $\times 10^0$

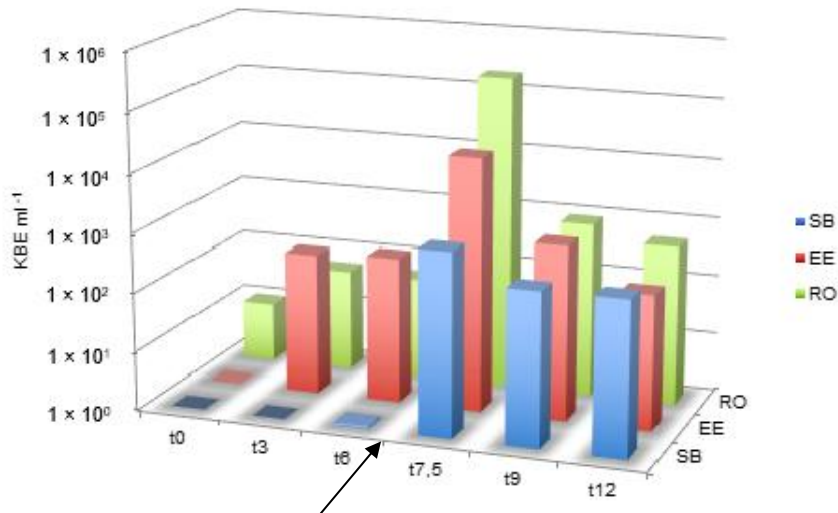
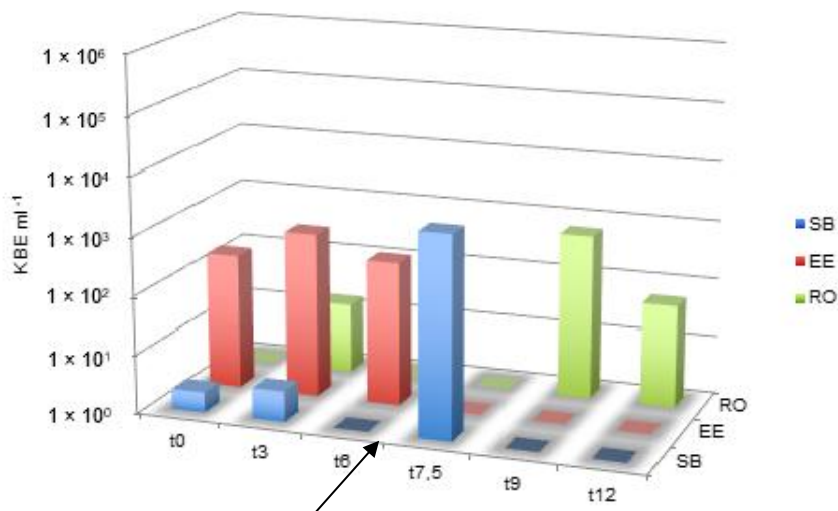
Chryseobacterium spp.Flavobacterium spp.

Abbildung 44: Konzentration auf DEV-Agar kultivierter *Chryseobacterium* spp. und *Flavobacterium* spp. aus den Aquarienwasserproben der drei Versuchsanlagen Fütterungsversuch 1. Darstellung als dreidimensionales Balkendiagramm zur Verdeutlichung der Veränderung über den Inkubationszeitraum. Gezeigt sind die Konzentrationen kultivierbarer Bakterien als Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe je Probenahmezeitpunkt und Anlage. Dargestellt sind die Mittelwerte für die jeweils drei parallel geschalteten Aquarien mit Standardabweichungen. tx: Probenahmezeitpunkte angegeben in Wochen. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage. Schwarze Pfeile zeigen Fütterungszeitpunkt

Von den untersuchten Blutegeln wurden egelessoziierte Bakterien aus neun Gattungen isoliert, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Ochrobactrum*, *Delftia*, *Comamonas*, *Aeromonas*, *Yokenella* und *Morganella* spp. (Abbildung 45). Die meisten Isolate stammten aus drei Taxa, *Ochrobactrum* spp. (24 Isolate), *Aeromonas allosaccharophila* (12 Isolate) und *Aeromonas veronii/ichtiosoma* (21 Isolate). *Ochrobactrum* spp. wurden in allen beprobten gesunden Blutegeln vor der Blutfütterung nachgewiesen, ebenso in den kranken Tieren nach der Blutfütterung, außer in den Tieren aus der RO-Anlage. Insgesamt traten drei verschiedene Stämme auf (d. h. Isolate mit verschiedenen BOX-Fingerprint Mustern). In den gesunden Tieren wurden nach der Fütterung keine *Ochrobactrum* spp. nachgewiesen. Stattdessen wurden Bakterien der Gattungen *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Delftia* und *Yokenella* aus den gesunden Tieren nach der Fütterung kultiviert. *Aeromonas* spp. wurde in der EE-Anlage vor der Fütterung aus allen Proben isoliert.

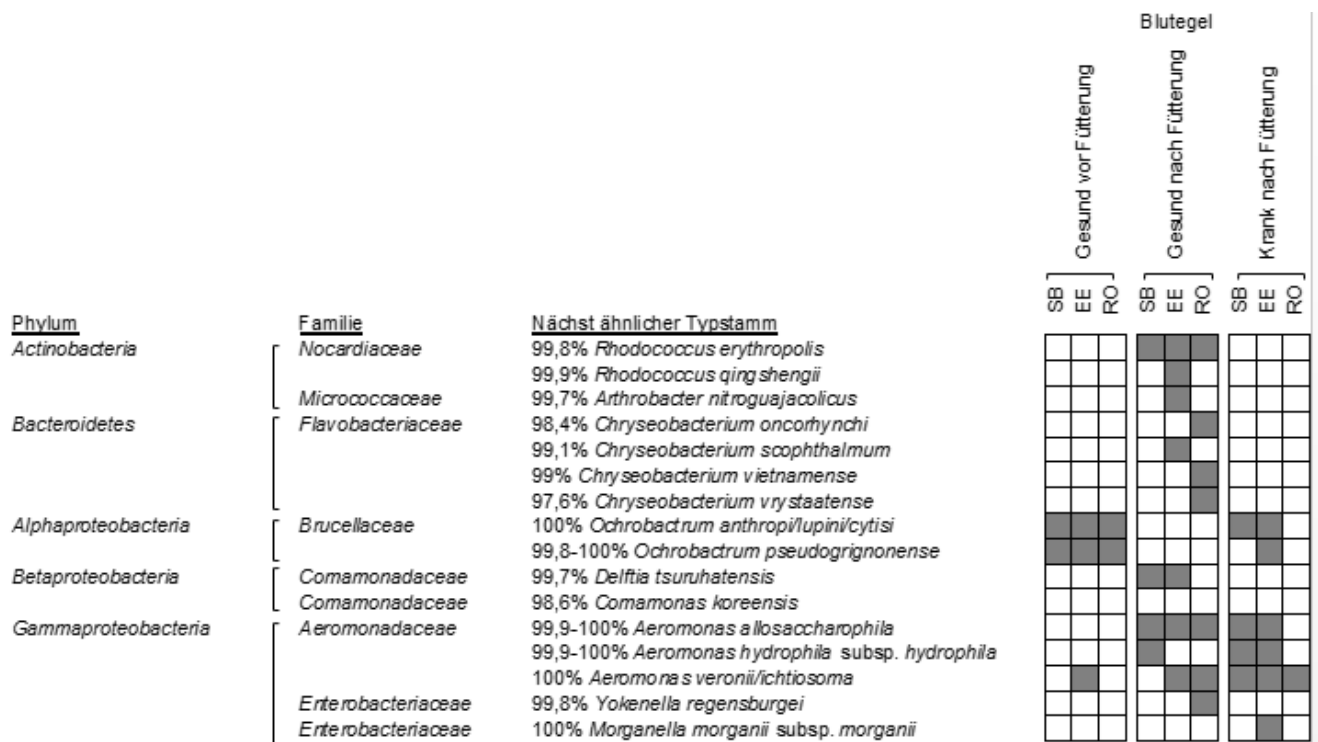


Abbildung 45: Phylogenetische Zuordnung abundanter, auf R2A und Blutagar kultivierter egelessoziierter Bakterien. Anzahl analysierter Isolate: EE: 25, RO: 17, SB: 20; Fütterungsversuch 1. Die phylogenetische Zuordnung erfolgte über EzTaxon (Kim et al. 2012). EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosroseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

### 3.1.7.5 Sterberaten und Gewichte der Bluteigel in Fütterungsversuch 1

Die Sterberaten der Bluteigel in den Anlagen lagen vor der Fütterung zwischen 4% und 11%. Nach der Blutfütterung stiegen die Raten in allen Anlagen, um 9% in der RO-Anlage, um 17% in der EE-Anlage und um 25% in der SB-Anlage. Vor der Blutfütterung zeigten die Anlagen signifikant unterschiedliche Sterberaten, nach der Blutfütterung unterschied sich nur noch die RO-Anlage signifikant von den anderen Anlagen (Tabelle 12, Abbildung 46).

Tabelle 12: Sterberaten (in %) und Anzahl der gestorbenen Bluteigel in den Anlagen vor und nach der Blutfütterung in Fütterungsversuch 1; Mittelwerte und Standardabweichung (SD) ermittelt über drei parallel geschaltete Aquarien je Anlage. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

	EE-Anlage	RO-Anlage	SB-Anlage
Anzahl vor Fütterung	158	57	66
SD	5,0	1,5	1,7
Sterber. v. Fütterung	11%	4%	4%
SD	0%	0%	0%
Anz. nach Fütterung	423	201	436
SD	6,0	2,9	6,2
Sterber. n. Fütterung	28%	13%	29%
SD	0%	0%	0%

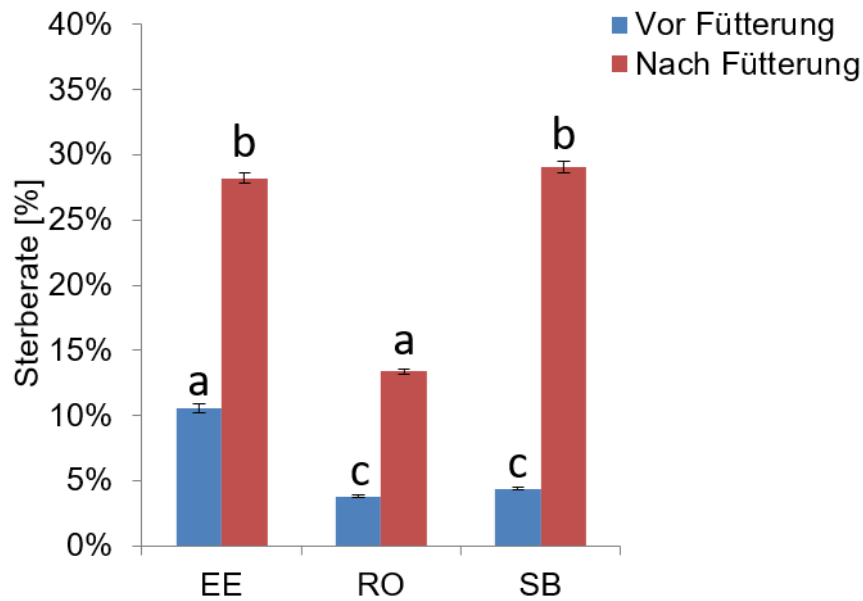


Abbildung 46: Sterberaten (in %) der Blutegel in den Anlagen des Fütterungsversuchs 1, vor und nach der Blutfütterung. Raten wurden mittels Multivarianzanalyse statistisch verglichen (ANOVA-Analyse mit Tukey Test; SigmaPlot, SYSTAT); unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $P \leq 0,05$ . Mittelwerte und Standardabweichungen beruhen auf den Werten von drei parallel geschalteten Aquarien je Anlage. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Das höchste Endgewicht, bezogen auf 250 Blutegel, zeigte die EE-Anlage, hier lag der Zuwachs bei 344 g. Allerdings überlebten in dieser Anlage nur wenige kranke und kleine Tiere, wodurch die Beurteilung des absoluten Gewichts verfälscht wurde. Die anderen Anlagen zeigten Gewichtszunahmen von 119 g (RO-Anlage) und 138 g (SB-Anlage) (Tabelle 13, Abbildung 47).

Tabelle 13: Gewicht von 250 Blutegeln zu Beginn und zum Ende des Fütterungsversuchs 1, aufgelistet für die einzelnen Anlagen sind Mittelwert und Standardabweichungen (SD) für die je drei parallel geführten Aquarien. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

	EE-Anlage	RO-Anlage	SB-Anlage
Besatz	231,25 g	231,25 g	231,25 g
Gew. Versuchsende	575,10 g	350,55 g	369,83 g
SD	71,70 g	9,40 g	27,80 g

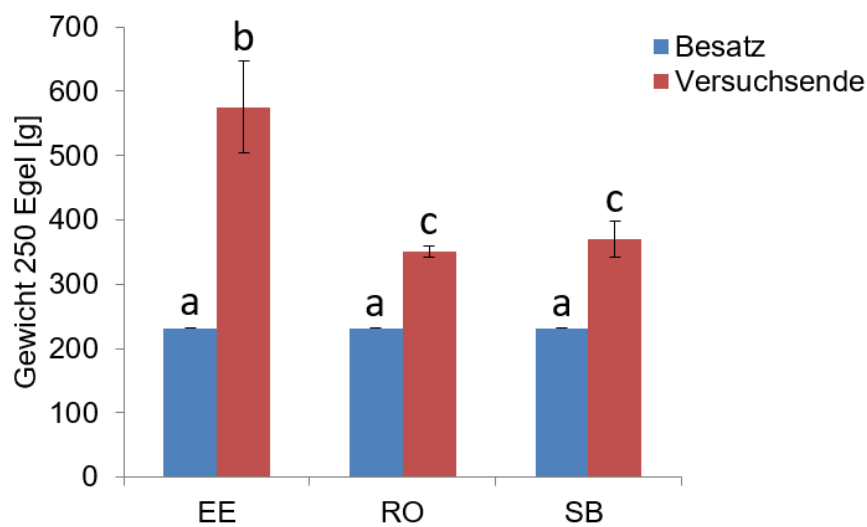


Abbildung 47: Gewicht von 250 Blutegeln (errechnet aus Durchschnittsgewichten) zu Beginn und Ende des Versuchszeitraums Fütterungsversuch 1. Gezeigt werden Mittelwerte über drei Aquarien für die einzelnen Anlagen mit dazugehöriger Standardabweichung. Statistische Auswertung erfolgte jeweils zwischen den Anlagen bei Besatz und zum Versuchsende (ANOVA-Analyse mit Tukey Test) und wurde in SigmaPlot (SYSTAT) durchgeführt; unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $P \leq 0,05$ . Mittelwerte und Standardabweichungen beruhen auf den Werten von drei parallel geschalteten Aquarien je Anlage. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

### 3.1.7.6 Zusammenfassung der Ergebnisse Fütterungsversuch 1

Hydraulisch und technisch liefen die Kreislaufsysteme, nach den genannten Änderungen, gut. Die eingesetzte Technik war, abgesehen von der Eichenextraktdosierung, zuverlässig und stabil. Alle technischen Komponenten waren nach Versuchsende ohne erkennbare Defekte oder Verschleiß. Die Handhabbarkeit war auch für angelernte Mitarbeiter zu bewältigen, so dass sich hieraus keine Störungen ergaben. Die erwartete starke Dämpfung von Konzentrationsschwankungen bei Stickstoffprodukten trat ein, Änderungen in einzelnen Aquarien hatten nur sehr geringen Einfluss auf die hydraulisch verbundenen Aquarien.

Die mikrobiologischen Untersuchungen zeigten deutlich, dass die unterschiedlichen Wasserbehandlungssysteme einen großen Einfluss auf die Abundanz und Zusammensetzung der wasserassoziierten Bakteriengemeinschaften hatten. Die Blutfütterung führte bei allen unterschiedlichen Behandlungssystemen zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration wasserassoziierten Bakterien. Die Zunahme der Konzentration kultivierbarer Bakterien beruhte bei den verschiedenen Behandlungssystemen generell auf Veränderung der Abundanz verschiedener Mikroorganismen. Die Veränderung der Abundanz wurde an zwei Beispielen genauer betrachtet (*Flavobacterium* spp. und *Chryseobacterium* spp.).

Die drei verwendeten Medien zeigten zum Teil sehr unterschiedliche Diversitäten. So konnten von dem EMB-Medium deutlich weniger abundante Bakterien isoliert werden als vom DEV-Medium. Die beabsichtigte Detektion von *Enterobacteriaceae*, v. a. coliformer Bakterien, mittels EMB war auf Grund des Wachstums schleimiger Kolonien nicht möglich. Im Vergleich von R2A und DEV zeigte DEV die bessere Auswertbarkeit und höchste Diversität, auf R2A dagegen wurden einige Bakterien nachgewiesen, die auf DEV nicht wuchsen. R2A zeigte als einziges Medium Probleme mit Pilzwachstum und schwärmenden Bakterien. Bestimmte abundante Bakteriengruppen, wie die *Chryseobacterium* spp., konnten auf allen drei Medien in allen Anlagen und auch nahezu über den gesamten Versuchszeitraum isoliert werden. Andere Bakteriengattungen, wie *Mykobakterien*, konnten besonders gut auf DEV detektiert werden. Die geringe Diversität auf dem EMB Medium korreliert mit der geringen Anzahl an Isolaten im Vergleich zu den anderen beiden Medien.

In den Anlagen war ein vermehrtes Bluterbrechen durch die Blutegel zwei Tage nach der Blutfütterung zu beobachten. In der EE-Anlage kam es zu deutlich weniger Erbrechen, da hier deutlich weniger Tiere überhaupt gefressen hatten. Zwischen den RO- und SB-Anlagen konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Die kultivierungsabhängig nachgewiesenen blutegelassoziierten Bakterien gehörten zum großen Teil Gattungen an, die als Symbionten der Blutegel

bekannt sind: *Aeromonas*, *Ochrobactrum* und *Morganella*. *Aeromonas* spp. und *Morganella* spp. kommen im Verdauungstrakt der Blutegel vor, für *Aeromonas* spp. ist eine symbiontische Interaktion bekannt, die Rolle von *Morganella* spp. ist dagegen unklar (Kikuchi et al. 2009). *Ochrobactrum* spp. wurden in hoher Abundanz in den Blasen/Nephridien der v nachgewiesen, auch dessen Interaktion mit den Blutegeln ist noch weitgehend ungeklärt (Kikuchi et al. 2009). Die anderen kultivierten Bakterien wurden alle aus den Aquarienwasserproben isoliert. Da diese Isolate alle aus einer Probenahme stammen, ist es möglich dass diese Bakterien beim Waschen der Blutegel vor der Präparation nicht vollständig von der Blutegeloberfläche gelöst werden konnten, oder von den Blutegeln in den Verdauungstrakt aufgenommen wurden. *Aeromonas hydrophila* konnte fünfmal detektiert werden, zweimal bei Blutegeln der SB-Anlage, einmal bei Blutegeln der EE-Anlage und jeweils einmalig im Aquarienwasser der EE- und RO-Anlagen. Ein mehrfacher Nachweis von *Aeromonas hydrophila* ist für Blutegel aus der bbez eher ungewöhnlich. Es konnten keine Unterschiede der egelessoziierten Bakterien zwischen den gesunden und kranken Blutegeln gefunden werden. Nur das Auftreten wasserassoziierter Bakterien in den Egelproben kurz nach der Blutfütterung war auffällig.

Zu Beginn des Fütterungsversuchs 1 waren alle eingesetzten Blutegel gesund. Eingesetzt wurden alle Tiere in Wasser mit leicht basischem pH (ca. pH 7,5). Nach dem Absenken des pH in der EE- und der RO-Anlage zeigten nahezu alle Tiere in beiden Anlagen Anzeichen von Unwohlsein. Sie verließen das Wasser und hielten sich in Clustern am Aquarienrand auf Höhe der Wasseroberfläche auf. Die Tiere der RO-Anlage gingen nach zwei Wochen Umstellungszeit wieder ins Wasser und verhielten sich unauffällig. Die Sterberate der Tiere in der RO-Anlage stieg vor der Fütterung im Vergleich zu den anderen Anlagen deutlich, sie haben bei der Blutfütterung kaum gefressen und direkt nach der Fütterung viel Blut wieder erbrochen. In den anderen beiden Anlagen (EE- und SB-Anlage) waren die Sterberaten vor der Fütterung vergleichbar gering und alle Tiere haben bei der Fütterung gut Blut aufgenommen.

In der EE-Anlage wurde die pH-Einstellung per Handdosierung (Infusionsbesteck) versucht. Vor dem Einsetzen der Blutegel war das möglich, nach dem Einsatz der Blutegel waren die pH-Schwankungen erheblich. Die meisten Tiere verließen direkt nach dem ersten pH-Ab- und Wiederanstieg das Wasser und hielten sich nahezu die ganze Zeit vor der Fütterung etwa in Höhe der Wasseroberfläche hängend auf. Nach einigen Wochen begannen die ersten Tiere zurück ins Wasser zu fallen, sie lagen dann zusammen gerollt am Aquarienboden.

Die Tiere in der SB-Anlage verhielten sich über den gesamten Versuchszeitraum normal, fraßen normal und erbrachen nach der Fütterung im normalen Rahmen Blut.

Die Gewichtszunahme pro Blutegel war in der EE-Anlage, den Zahlen nach, am größten, allerdings wurden zum Abschluss alle Tiere gewogen, also auch die kranken, schwachen und die, welche kein Blut zu sich genommen hatten. Durch diesen Fehler wog die geringe Anzahl überlebender, aber gefütterter Tiere je Blutegel mehr als in den Anlagen, in denen auch die kleinen und schwachen überlebt haben. Das Ergebnis wurde somit verfälscht. In allen Anlagen, besonders in der RO-Anlage, bekamen die Tiere nach der Fütterung Einschnürungen am Körper, ein Zeichen für eine Erkrankung. Diese Symptome waren allerdings, mit der Verbesserung der chemischen Wasserwerte, bei den meisten Tieren nach mehreren Wochen wieder verschwunden.

### **3.1.8 Modifizierte Fütterungsversuche 2 und 3**

Aufbauend auf den Erkenntnissen des Pilotversuches und des anschließenden Fütterungsversuches 1 wurden die Haupt-Versuchsanlage, in welcher der Fütterungsversuch 1 durchgeführt worden war und die Durchführung in folgenden Punkten modifiziert. Folgende Modifikationen wurden für den Fütterungsversuch 2 durchgeführt:

- Da die Blutegel in der RO-Anlage ungewöhnlich inaktiv waren, nicht gesund erschienen und vermehrt starben, wurde kein RO-Wasser mehr verwendet; statt dessen wurde Leitungswasser mittels CO<sub>2</sub> Einbringung angesäuert; die Bezeichnung RO-Anlage wurde beibehalten. (Es wurde vermutet, dass den Blutegeln essentielle Spurenelemente im Wasser fehlten, die trotz Meersalzzugabe nicht ersetzt wurden.)
- Der CO<sub>2</sub> Reaktor wurde aus Sicherheitsgründen durch ein leistungsfähigeres Modell ersetzt.
- Die Blutegel wurden in der EE- und der RO-Anlage in das angesäuerte Milieu eingesetzt.
- In die hydraulischen Kreisläufe der drei Anlagen wurde je ein Kühlaggregat integriert, um bei erhöhter Raumtemperatur die Wassertemperatur in den Versuchsanlagen konstant halten zu können; diese Komponenten waren als einzige in einem Nebenraum untergebracht.

Die in Fütterungsversuch 2 in das saure Milieu eingesetzten Blutegel zeigten sehr schnell Zeichen von Unwohlsein, verhielten sich sehr inaktiv und wollten nicht fressen; der Versuch wurde daher nach kurzer Zeit abgebrochen.

Modifikation für Fütterungsversuch 3:

- Die Absenkung des pH in der EE- und der RO-Anlage wurde erst nach dem Einsetzen der Blutegel vorgenommen.

### **3.1.8.1 Durchführung des Fütterungsversuchs 2**

Die erneute Befüllung der Anlagen mit Wasser erfolgte am 15.04.2014, nach einer gründlichen Reinigung und Desinfektion der gesamten wasserbenetzten Anlagenkomponenten mithilfe von Perform (Fa. Schülke + Mayr, Norderstedt), so dass sich die Wassertemperatur an die Raumtemperatur angleichen konnte. Alle technischen Einrichtungen wurden in den Tagen vor Versuchsstart auf ihre Funktion geprüft. In der EE-Anlage wurde per Handdosierung des Extraktes der pH auf ca. 6,7 eingestellt. Die RO-Anlage wurde mit Leitungswasser befüllt, mittels CO<sub>2</sub> wurde der pH auf ca. 6,7 abgesenkt.

Fütterungsversuch 2 wurde am 18.04.2014 mit den ersten Beprobungen und dem Einsatz der Blutegel gestartet. In die neun Aquarien wurden je 500 *H. verbana* aus der gleichen Charge mit ähnlicher Größe (im Mittel 0,7g) zusammen gewogen und eingesetzt. Wöchentlich wurden Teilwasserwechsel vorgenommen, je Anlage wurden 200 Liter Leitungswasser in die Pufferspeicher eingeleitet. Über einen Überlauf lief die entsprechende Wassermenge ab, womit auch Verdunstungsverluste ersetzt wurden. Während des Versuchszeitraums wurden in gleicher Regelmäßigkeit und bedarfsgemäß die gleichen Parameter gemessen und Proben genommen wie in Fütterungsversuch 1. Abgebrochen wurde der Fütterungsversuch 2 am 06.05.14, ohne dass eine Fütterung durchgeführt wurde, weil die Tiere in der EE- und der RO-Anlage ungewöhnlich inaktiv und passiv waren, seit sie in das saure Milieu eingesetzt wurden. Sie erholten sich auch nicht, wie das im Pilotversuch der Fall gewesen war. Es wurde keine Abschlusszählung vorgenommen. Die Messungen und Beprobungen wurde wie in Fütterungsversuch 1 durchgeführt (3.1.7.1).

### **3.1.8.2 Durchführung und Ergebnisse des Fütterungsversuchs 3**

Vor Versuchsbeginn wurde die gesamte Anlage am 30.07.2014 gründlich gereinigt und mittels Perform desinfiziert, anschließend mit RO- bzw. Leitungswasser befüllt, alle technischen Komponenten in Betrieb genommen und auf Funktion und Dichtigkeit überprüft. In die 9 Aquarien wurden am 04.08.2014 je 500 *H. verbana* aus der gleichen Charge mit ähnlicher Größe (im Mittel 0,67g) eingewogen. Danach wurde in der EE- und der RO-Anlage mit der Absenkung des pH begonnen. Dabei wurden die Blutegel beobachtet und die Absenkung so gesteuert, dass die Blutegel keine Anzeichen von Unbehagen zeigten. Bis zum 03.09.2014 war die Absenkung auf pH 6,7 abgeschlossen und die pH-Regelung blieb in beiden Anlagen unverändert. Am 03.09.2014 fand eine Fütterung in allen neun Aquarien statt, am 04.09.2014 wurden die Blutegel, die offensichtlich nicht gefressen hatten, aus den Aquarien entfernt und gezählt. Auf

fiel, dass die Blutegel in der RO-Anlage in geringerem Maße fraßen als in den beiden anderen Anlagen.

Das mikrobiologische Monitoring begann am 04.08.2014 und wird in Abbildung 48 im zeitlichen Verlauf dargestellt.

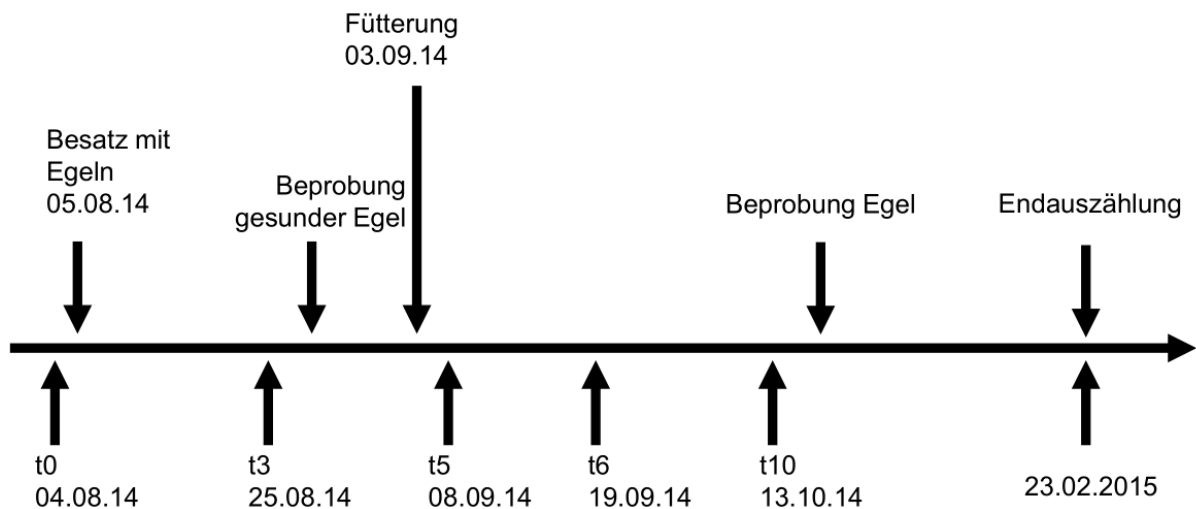


Abbildung 48: Zeitverlauf der Beprobungen während des Fütterungsversuchs 3. tx bezeichnen Zeitpunkte der Probenahme, Angaben in Wochen; dbf: Anzahl der Tage vor der Blutfütterung; daF: Anzahl der Tage nach der Blutfütterung.

In der RO-Anlage begann ab der Fütterung am 03.09.2014 ein auffälliges Sterben der Blutegel, das sich weiter fortsetzte. Wegen der großen Verluste an Blutegel wurde die RO-Anlage am 18.10.2014 außer Betrieb genommen und die verbliebenen Blutegel ausgezählt. Ab dem 25.09.2014 begannen auch die Blutegel in der EE-Anlage vermehrt zu sterben. Hier wurde der Versuch bis zum 15.01.2015 fortgesetzt und nach Auszählung ebenfalls vorzeitig abgebrochen. Bis dahin hatte die Zahl der verstorbenen Blutegel nahezu das gleiche Niveau erreicht wie in der RO-Anlage bis zum Abbruch (Abbildung 63). Es lief also nur die SB-Anlage bis zum geplanten Versuchsende am 23.02.2015. Bei Versuchsende wurden die verbliebenen Blutegel in gesunde und kranke sortiert, die gesunden wurden abschließend gewogen. Die Messungen und Beprobungen wurden wie in Fütterungsversuch 1 durchgeführt (3.1.7).

### 3.1.8.3 Ergebnisse zur Verfahrenstechnik in Fütterungsversuch 3

Die eingesetzten Kontroll- und Steuerungstechnik erwies sich als funktionell und zuverlässig. Die zu steuernden Parameter pH und Temperatur sowie die Durchflussrate konnten in den

gewünschten Bereichen gehalten werden. Die Temperatursteuerung erfolgte einerseits über die Raumluftheizung (Konvektionsheizkörper an Zentralheizung), bei Überschreitung der Solltemperatur durch hydraulisch eingebundene elektrische Wasserkühler. Die Dosierung von sowohl CO<sub>2</sub> als auch Eichenextrakt erfolgte automatisiert und so genau, dass das gewünschte saure Milieu stabil gehalten werden konnte, flüssiger Eichenextrakt wurde mittels Dosierpumpe und elektronischer Regelung zugegeben. Lediglich die pH-Sonde musste regelmäßig kalibriert werden. Das Gleiche galt für die Zugabe von gasförmigem technischem CO<sub>2</sub>. Die Dosierung und Diffusion des CO<sub>2</sub> in dem Reaktor erfolgte zuverlässig und ausreichend, um die Abpufferung der Wasserstoffionen im Haltungswasser auszugleichen. Diese Abpufferung erfolgte vermutlich überwiegend durch die Ammoniumausscheidungen als Verdauungsprodukt in das Haltungswasser durch die Blutegel (Abbildung 49).

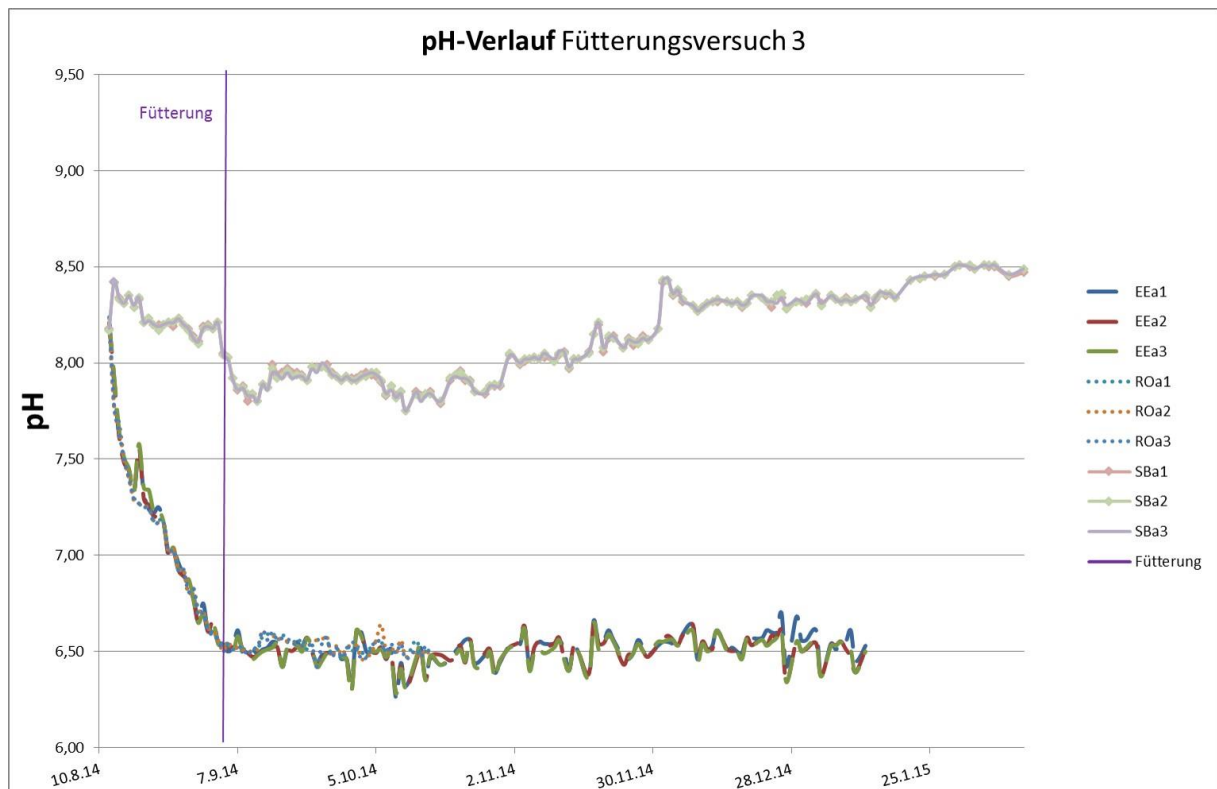


Abbildung 49: Verlauf pH in den Aquarien, Fütterungsversuch 3;

XXax: XX = Anlage, x = Aquarium der jeweiligen Anlage (Triplikate).

### 3.1.8.4 Ergebnisse zur Chemischen Wasserqualität in Fütterungsversuch 3

Die eingesetzte Filtertechnik war insoweit stabil, dass eine Ammonium- und danach Nitritoxidation erkennbar stattfanden. Die Ammoniumkonzentration stieg in allen Anlagen kurz nach

der Fütterung an. In der EE- und der SB-Anlage stieg sie nach der Fütterung innerhalb weniger Tage auf maximal 0,6 mg/l, in der RO-Anlage dagegen auf 4 mg/l, also deutlich stärker. In allen Anlagen waren die Konzentrationen wenige Tage nach dem Anstieg wieder auf Konzentrationen unter 0,2 mg/l gefallen (Abbildung 50). In der Folge stieg die Nitritkonzentration an, in der SB-Anlage bis auf 1 mg<sup>-1</sup> und somit am stärksten, in der EE-Anlage auf 0,4 mg/l und in der RO-Anlage auf 0,6 mg/l. Innerhalb weniger Tage waren die Konzentrationen von Nitrit in allen Anlagen wieder unter 0,1 mg/l gesunken (Abbildung 51). Die Nitratkonzentration stieg in allen Anlagen nach der Fütterung etwa 45 Tage lang kontinuierlich an und erreichte Konzentrationen zwischen 170 und 210 mg/l, bevor sie langsam wieder abnahmen. Etwa zum Zeitpunkt der höchsten Nitratkonzentration wurde die RO-Anlage außer Betrieb genommen, in der EE-Anlage war die Nitratkonzentration bis zur Außerbetriebnahme wieder auf 50 mg/l gefallen, in der SB-Anlage sank sie bis zum Versuchsende ebenfalls auf diese Konzentration (Abbildung 52). Hierzu trugen sicher die regelmäßigen Wasserwechsel bei.

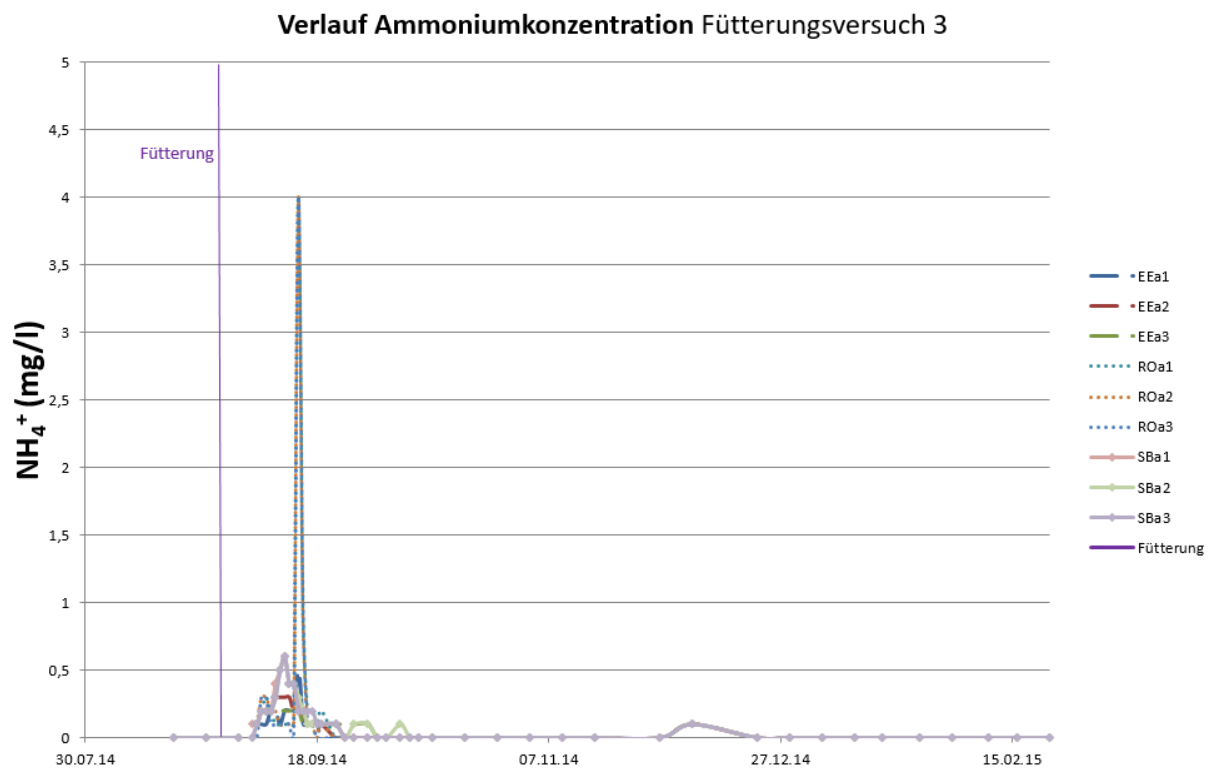


Abbildung 50: Verlauf der Ammoniumkonzentration in Aquarien, Fütterungsversuch 3;

XXax: XX = Anlage, x = Aquarium der jeweiligen Anlage (Triplikate).

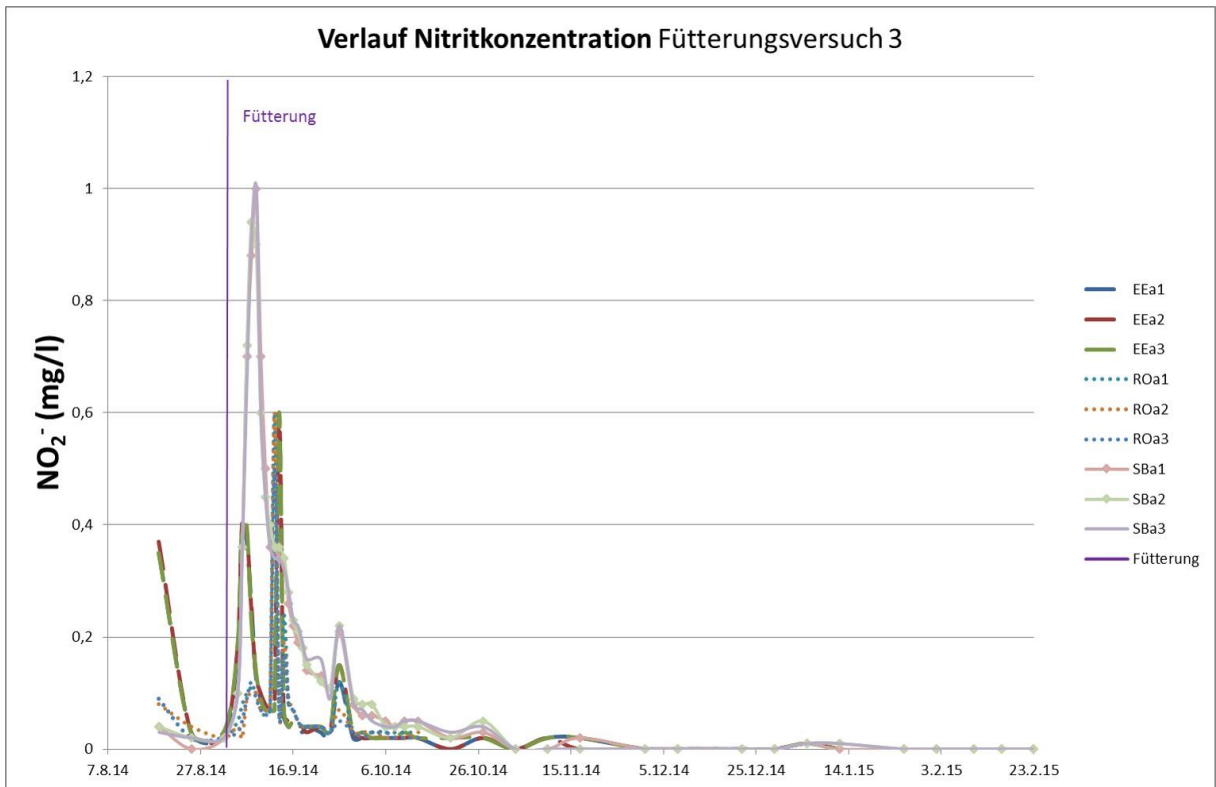


Abbildung 51: Verlauf der Nitritkonzentration in Aquarien, Fütterungsversuch 3;  
 XXax: XX = Anlage, x = Aquarium der jeweiligen Anlage (Triplikate).

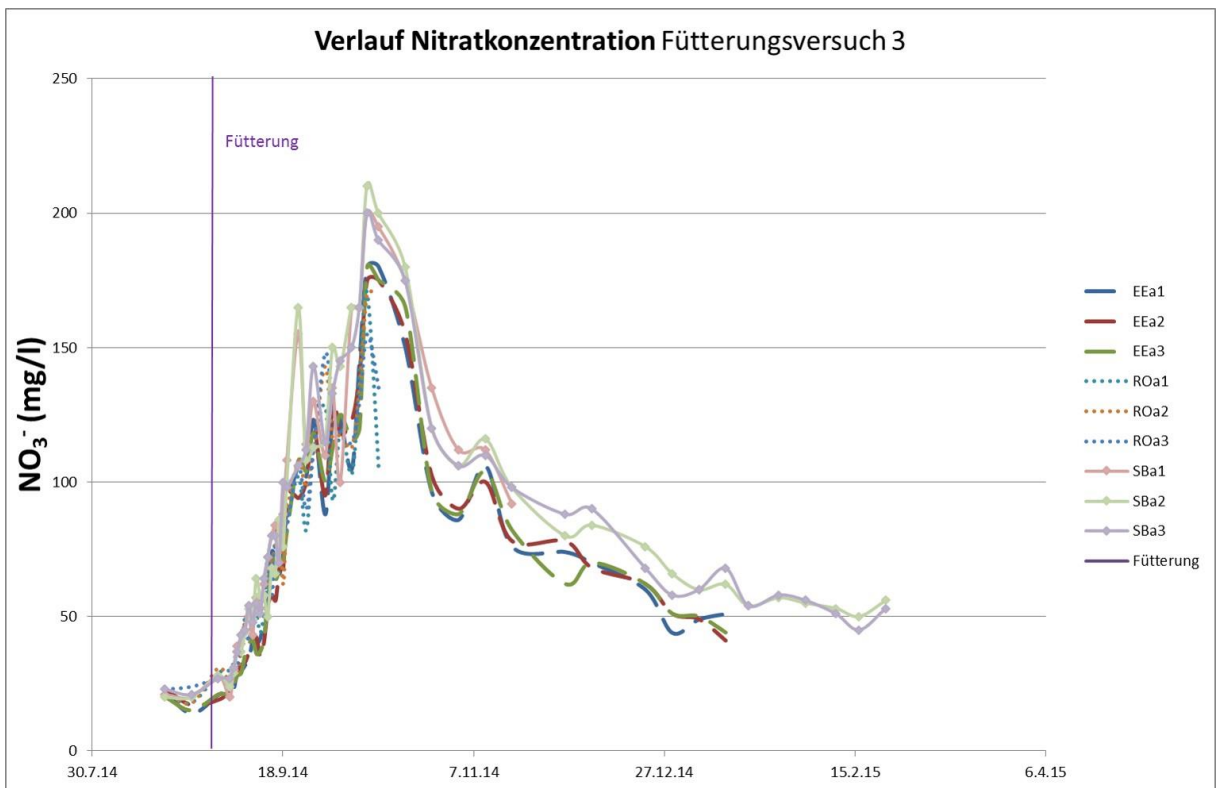


Abbildung 52: Verlauf der Nitratkonzentration in Aquarien, Fütterungsversuch 3;  
 XXax: XX = Anlage, x = Aquarium der jeweiligen Anlage (Triplikate).

Der chemische Sauerstoffbedarf CSB wurde nicht in einzelnen Aquarien, sondern in den jeweiligen Pumpensämpfen gemessen. In der SB-Anlage stieg die Konzentration von 5 mg/l etwa zwei Wochen vor der Fütterung innerhalb einer Woche auf 11 mg/l und fiel anschließend bis zur Fütterung wieder auf unter 2 mg/l. In den beiden anderen Anlagen (EE- und RO-Anlage) lag die Konzentration bei der ersten Messung bei 3 mg/l (RO) bzw. bei 4 mg/l (EE). Sie stieg vor der Fütterung im selben Zeitraum wie in der SB-Anlage in beiden Anlagen auf 13 mg/l. Auch in diesen Anlagen fiel die Konzentration bis zur Fütterung auf 3 mg/l (RO) bzw. 4 mg/l (EE). Dies weist darauf hin, dass alle Filter nach einer kurzen Einlaufphase (organische) Substanz oxidieren konnten. Etwa zehn Tage nach der Fütterung stieg in allen Anlagen die Konzentration nochmals kurzzeitig auf 8 mg/l (RO-Anlage) bzw. 9 mg/l (SB-Anlage), in der EE-Anlage war dieser Anstieg mit einer Konzentration von 5 mg/l deutlich geringer. Ein zwischenzeitlicher Konzentrationsanstieg in den Anlagen, etwa fünf Tage nach der Fütterung, fällt zusammen mit dem Konzentrationsanstieg des Ammoniums. Als Summenparameter erfasst der CSB auch die im Wasser vorhandenen Stickstoffprodukte (Abbildung 53). Der CSB-Konzentrationsverlauf in den drei Anlagen war sehr ähnlich.

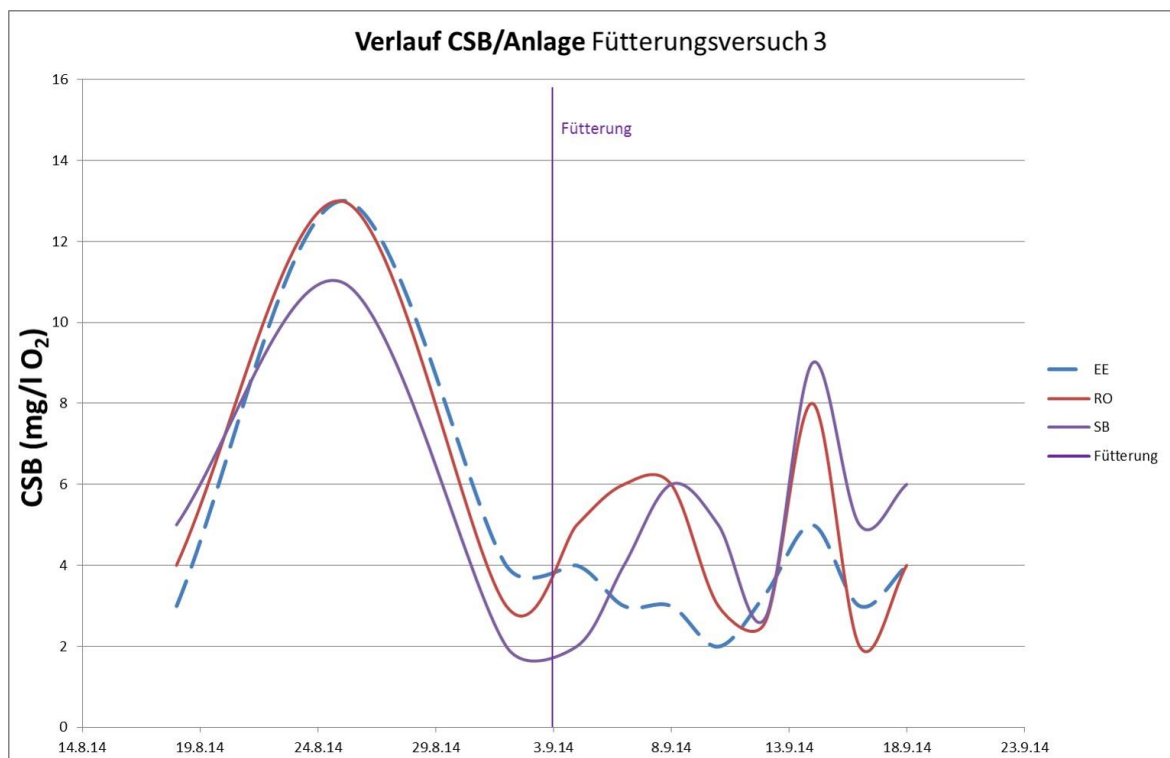


Abbildung 53: Der chemische Sauerstoffbedarf CSB der jeweiligen Anlagen, Fütterungsversuch 3; gemessen wurde in den zugehörigen Pumpensämpfen.

Der gesamte organische Kohlenstoff TOC ist ebenfalls ein Summenparameter für die organische Verunreinigung des Wassers. Er stieg in allen Anlagen von einer Ausgangskonzentration unter 2 mg/l bis zur Fütterung auf ca. 3 mg/l und pendelte um diese Konzentration, bis er etwa 10 Tage nach der Fütterung in der SB-Anlage auf 15 mg/l, in der RO-Anlage auf 9 mg/l, und in der EE-Anlage auf 4 mg/l anstieg. Dies fällt zusammen mit der höchsten Konzentration des CSB. Direkt darauf nahm die Konzentration in allen Anlagen wieder schnell auf 1-3 mg/l ab (Abbildung 54).

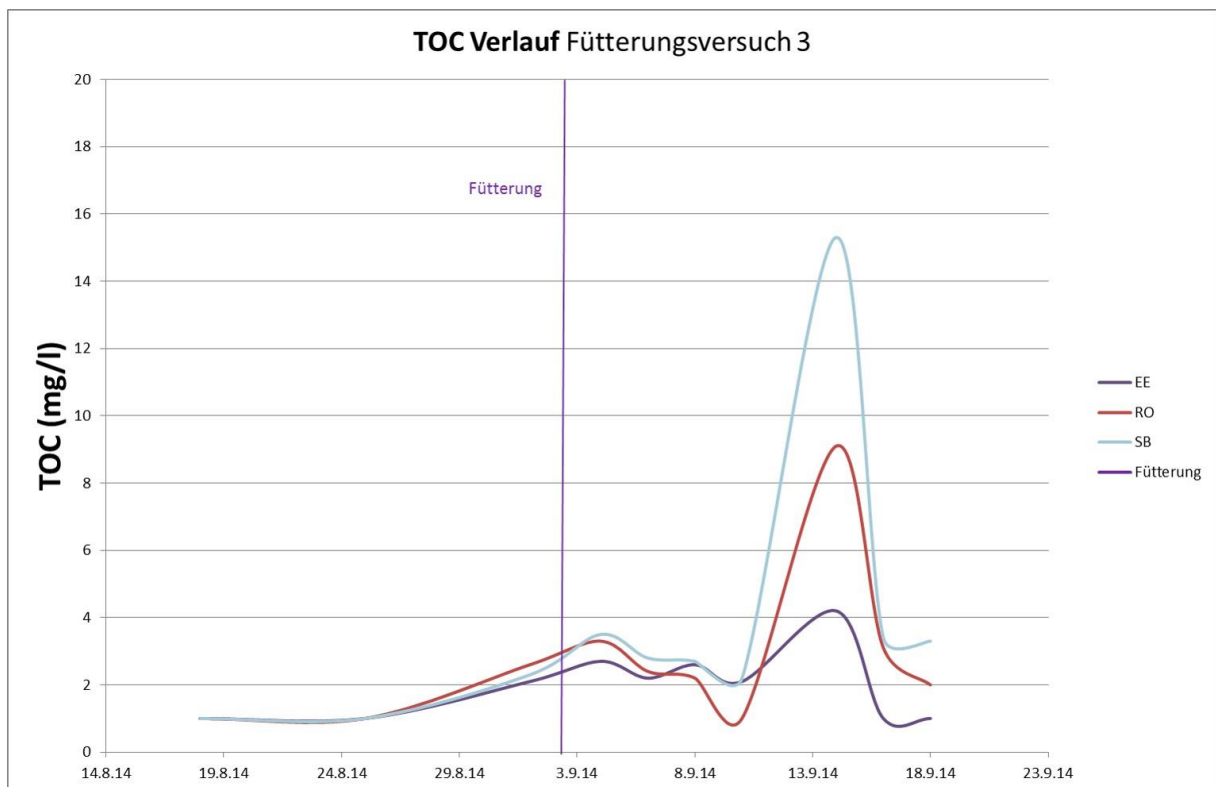


Abbildung 54: Konzentrationsverlauf des gesamten organischen Kohlenstoffs TOC in den Anlagen, Fütterungsversuch 3; gemessen wurde in den zugehörigen Pumpensämpfen.

### 3.1.8.5 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen Fütterungsversuch 3

Direkt vor dem Besatz der Aquarien mit Blutegelein wurde eine Wasserprobe je Becken zur mikrobiologischen Untersuchung entnommen ( $t_0$  Probe). Diese erste Beprobung fand am 04.08.2014 statt, die letzte Probe wurde am 13.10.2014 genommen. Für alle Aquarien wurde die Gesamtzellzahlen der wasserassoziierten Bakterien bestimmt (Tabelle 14, Abbildung 55). Die Zellzahlen lagen alle im Bereich von  $10^5$  Zellen/ml Wasser (Ausnahme: SB-Anlage,  $t_6$ :  $10^6$ ). Zu allen Probenahmezeitpunkten und in allen Versuchsanlagen lagen die Gesamtzellzahl-

Konzentration eine, meist zwei Zehnerpotenzen über der Konzentration kultivierbarer Bakterien ( $10^3$  bis  $10^5$  KBE/ml). Eine signifikante Zunahme der Gesamtzellzahl wasserassoziierter Bakterien direkt nach der Blutfütterung ( $t_5$ ), wurde nur bei der RO-Anlage beobachtet. Eine signifikante Zunahme der Konzentration wasserassoziierter Bakterien trat bei der SB-Anlage zwei Wochen nach der Fütterung auf ( $t_6$ ). Die Konzentration nahm in der SB-Anlage wieder signifikant ab (Tabelle 14, Abbildung 55). In der EE-Anlage traten während des gesamten Versuchs keine signifikanten Veränderungen auf. Signifikante Unterschiede zwischen den Anlagen traten nur vereinzelt auf. Zu dem Zeitpunkt  $t_3$ , d.h. vor der Blutfütterung traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anlagen auf. Direkt nach der Blutfütterung war die Konzentration wasserassoziierter Bakterien (Gesamtzellzahl) in der RO-Anlage signifikant höher als bei den anderen Anlagen. Zum Zeitpunkt  $t_6$  traf das für die SB-Anlage zu (Abbildung 55).

Tabelle 14: Konzentrationen der Gesamtzellzahl wasserassoziierter Bakterien in den Versuchsanlagen, Fütterungsversuch 3, ermittelt über epifluoreszenz-mikroskopische Gesamtzellzählung fixierter Zellen nach SybrGreen I Färbung. Dargestellt ist die Konzentration von Bakterienzellen/ml Wasserprobe je Probenahmezeitpunkt. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der drei parallel geschalteten Aquarien. Je Aquarium wurden Mittelwerte und Standardabweichungen aus 10 gezählten mikroskopischen Bildern berechnet. Die daraus resultierenden Standardabweichungen gingen über Fehlerfortpflanzung in die angegebenen Standardabweichungen mit ein. tx: Probenahmezeitpunkte in Wochen. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

	EE-Anlage	RO-Anlage	SB-Anlage
$t_3$	$2,3 (\pm 0,5) 10^5$	$2,4 (\pm 0,7) 10^5$	$2,1 (\pm 0,6) 10^5$
$t_5$	$1,8 (\pm 0,5) 10^5$	$1,9 (\pm 0,2) 10^6$	$3,7 (\pm 0,9) 10^5$
$t_6$	$2,2 (\pm 0,6) 10^5$	$5,4 (\pm 1,6) 10^5$	$1,1 (\pm 0,2) 10^6$
$t_{10}$	$2,8 (\pm 0,8) 10^5$	$5,1 (\pm 1,3) 10^5$	$5,8 (\pm 1,5) 10^5$

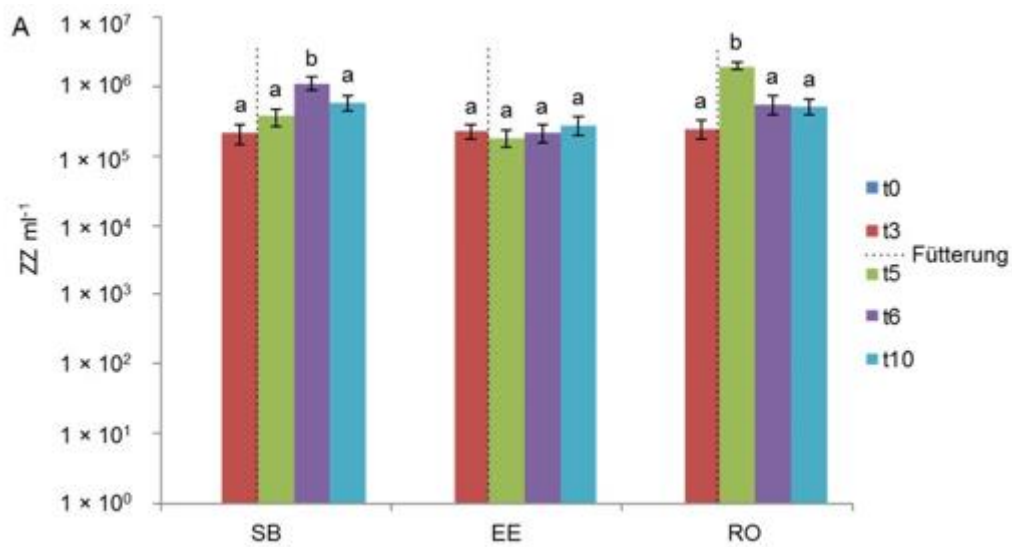


Abbildung 55: Konzentrationen im Aquarienwasser vorkommender Bakterien (Gesamtzellzahl) der Versuchsanlagen, Fütterungsversuch 3 (Angabe: Zellzahlen/ml Wasser) Dargestellt i. F. eines Balkendiagramms mit statistischem Vergleich zwischen den Probenahmezeitpunkten je Anlage (ANOVA-Analyse mit Tukey Test, SigmaPlot). Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ). Dargestellt sind die Konzentrationen der Gesamtbakterien/ml Wasserprobe in logarithmischer Darstellung je Probenahmezeitpunkt und Anlage (t0 wurde nicht analysiert). Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf die drei parallel geschalteten Aquarien. Je Aquarium wiederum wurden Mittelwerte und Standardabweichungen aus 10 gezählten mikroskopischen Bildern berechnet. Die daraus resultierende Standardabweichungen gingen über Fehlerfortpflanzung in die angegebenen Standardabweichungen mit ein. tx: Probenahmezeitpunkte in Wochen. Die Blutfütterung ist als schwarze gestrichelte Linie gekennzeichnet; für t0 liegen keine Daten vor. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Die Konzentration auf DEV-Agar kultivierter wasserassoziierter Bakterien lag zwischen  $10^3$  und  $10^5$  KBE/ml Wasser (Tabelle 15, Abbildung 56). Die EE-Anlage zeigte eine signifikante Abnahme der Konzentration kultivierbarer Bakterien zwischen t0 und t3, aber im darauf folgenden Verlauf des Experimentes keine weiteren signifikanten Veränderungen, auch nicht im Zusammenhang mit der durchgeführten Blutfütterung. In der SB-Anlage kam es zwei Wochen nach der Blutfütterung (t6) zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration auf DEV-Agar kultivierter Bakterien. Anschließend nahm die Konzentration wieder signifikant ab (zwischen t6 und t10). Gleiches gilt für die EE-Anlage. In der RO-Anlage kam es bereits direkt nach der Blutfütterung (t5) zu einem signifikanten Anstieg der auf DEV-Agar kultivierten wasserassozierten Bakterien. Die Konzentration blieb erhöht (t6) und nahm erst zu t10 wieder signifikant ab.

Tabelle 15: Konzentration auf DEV kultivierte wasserassoziierte Bakterien in den drei Versuchsanlagen, Fütterungsversuch 3. Die Konzentration kultivierbarer Bakterien ist angegeben in Koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml Wasser je Probenahmezeitpunkt tx (Angabe in Wochen). EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosroseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

DEV	EE-Anlage	RO-Anlage	SB-Anlage
t0	$9,1 (\pm 0,1) \times 10^3$	$1,4 (\pm 0,3) \times 10^3$	$7,9 (\pm 0,6) \times 10^3$
t3	$4,0 (\pm 1,0) \times 10^3$	$2,6 (\pm 0,1) \times 10^3$	$4,6 (\pm 0,3) \times 10^3$
t5	$2,9 (\pm 0,5) \times 10^3$	$1,6 (\pm 0,4) \times 10^4$	$7,6 (\pm 1,2) \times 10^3$
t6	$4,2 (\pm 0,7) \times 10^3$	$9,8 (\pm 4,0) \times 10^3$	$2,2 (\pm 0,5) \times 10^4$
t10	$2,2 (\pm 0,5) \times 10^3$	$1,4 (\pm 0,2) \times 10^3$	$7,2 (\pm 2,6) \times 10^3$

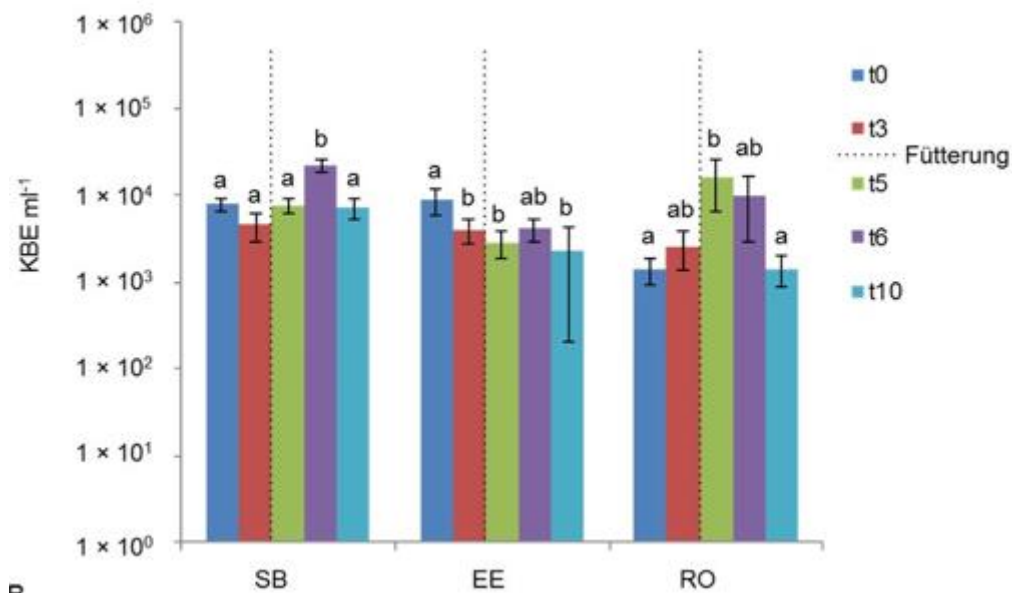


Abbildung 56: Konzentration auf DEV-Agar kultivierbarer wasserassoziierter Bakterien in den Anlagen Fütterungsversuch 3, angegeben als Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml Wasser. Dargestellt i. F. eines Balkendiagramms mit statistischer Auswertung (ANOVA-Analyse mit Tukey Test, SigmaPlot; unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ ). Gezeigt sind Konzentrationen kultivierbarer Bakterien als Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml Wasserprobe in logarithmischer Darstellung je Probenahmezeitpunkt und Anlage. Dargestellt sind Mittelwerte für jeweils drei parallel geschalteten Aquarien mit Standardabweichungen. Die Unterschiede, die sich zwischen den dreifachen Ausplattierungen je Aquarienprobe ergaben, wurden durch Fehlerfortpflanzung mitberücksichtigt. tx: Probenahmezeitpunkte angegeben in Wochen. Der Zeitpunkt der Blutfütterung ist als schwarze gestrichelte Linie markiert. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Zwischen den Anlagen konnten vereinzelt signifikante Unterschiede beobachtet werden, etwa signifikant höhere Konzentration an kultivierbaren Bakterien in der EE-Anlage im Vergleich zu der SB-Anlage zwei Wochen nach der Blutfütterung und am Ende des Experimentes. Direkt vor und nach der Blutfütterung waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anlagen zu beobachten.

Eine erste Betrachtung der Koloniemorphologie-Typen der kultivierbaren Bakterien zeigte deutliche Unterschiede in der Abundanz verschiedener Bakterien in den Anlagen. Die abundantesten Kolonien wurden vereinzelt und die Reinkulturen über molekulare Fingerprintanalyse vergleichend untersucht und über 16S rRNA Gensequenzierung phylogenetisch identifiziert. Insgesamt wurden von den auf DEV-Agar kultivierten Bakterien 170 der abundantesten

Kolonien ausgewählt und die entsprechenden Bakterien in Reinkultur gebracht und über partielle 16S rRNA Gensequenzierung (ca. 1.600 nt) phylogenetisch identifiziert. Hierzu wurden die Isolate über eine BLAST-Analyse der 16S rRNA Gensequenzen in der EzTaxon Typstammdatenbank (Kim et al. 2012) auf Gattungsebene zugeordnet. Die gewonnenen Isolate wurden drei Phyla zugeordnet, den *Actinobacteria* (75 Isolate), *Bacteroidetes* (30 Isolate) und *Proteobacteria* (65 Isolate) (*Alpha*-, *Beta*- und *Gamma*proteobacteria) (Abbildung 57).

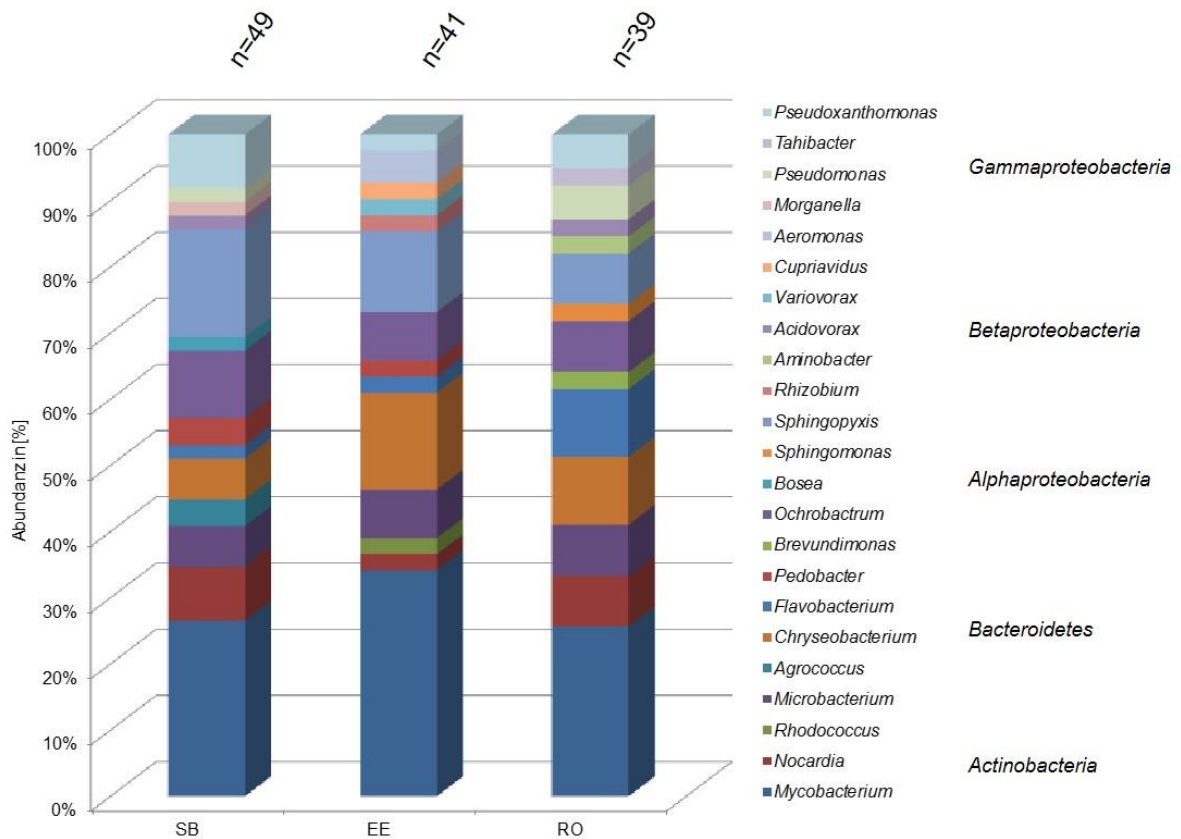


Abbildung 57: Relative Abundanz der abundantesten auf DEV-Agar kultivierten Bakterien aus den Aquarienwasserproben der Versuchsanlagen Fütterungsversuch 3. Vergleich der Abundanz detektierter Gattungen bei der Kultivierung in den verschiedenen Anlagen. Insgesamt wurden 129 Isolate analysiert (n = Anzahl Isolate).

Die 129 Isolate wurden innerhalb der drei Phyla 25 verschiedenen Gattungen zugeordnet. Davon waren sieben Gattungen in allen Anlagen zu finden (*Mycobacterium*, *Microbacterium*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Ochrobactrum*, *Sphingopyxis* und *Pseudoxanthomonas*). Isolate die den Gattungen *Cupriavidus*, *Variovorax*, *Comamonas*, *Bosea* und *Brevundimonas* zugeordnet wurden, wurden ausschließlich vor der Blutfütterung isoliert. Dagegen wurden Isolate, die den Gattungen *Tahibacter*, *Morganella*, *Aeromonas*, *Delftia*, *Aminobacter*, *Rhizobium*, *Pedobacter* und *Agrococcus* zugeordnet wurden, nur nach der Blutfütterung detektiert. Die Gattungen *Rhizobium* und *Morganella* wurden nur aus den Wasserproben der EE-Anlage isoliert und die Gattung *Aminobacter* nur aus den Wasserproben der RO-Anlage. Die Gattungen *Bosea* und *Morganella* wurden nur aus der SB-Anlage isoliert. Die häufigsten Gattungen (mehr als drei Nachweise) waren *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Microbacterium*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Ochrobactrum*, *Sphingopyxis*, *Pseudomonas* und *Pseudoxanthomonas*. Die weiteren Gattungen waren mit ein bis drei Isolaten vertreten und somit Einzelnachweise (Abbildung 58).

Phylum	Familie	Gattung	DEV															Anzahl der gepikten Isolate
			SB					EE					RO					
			t0	t3	t5	t6	t10	t0	t3	t5	t6	t10	t0	t3	t5	t6	t10	
Actinobacteria	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	3	2	2	2		3	1	3	2	1	4	2	2	1	1	29
	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i>	1	1	1	1					1		1	1		1		8
		<i>Rhodococcus</i>										1						1
	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	2				1			1	1	1	1		1		1	9
		<i>Agrococcus</i>			1	1												2
Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i>	1	1		1		1	1	1	2				1	1	1	11
		<i>Flavobacterium</i>	1						1				1	1	1		1	6
Alphaproteobacteria	Sphingobacteriaceae	<i>Pedobacter</i>				2					1							3
	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i>											1					1
	Brucellaceae	<i>Ochrobactrum</i>	2	1	1	1		1	2						1	2		11
	Methylobacteriaceae	<i>Bosea</i>	1															1
	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>											1					1
		<i>Sphingopyxis</i>	4		1	1	2	3	1		1		3					16
		<i>Rhizobium</i>									1							1
Betaproteobacteria	Phyllobacteriaceae	<i>Aminobacter</i>														1		1
	Comamonadaceae	<i>Acidovorax</i>			1								1					2
		<i>Variovorax</i>						1										1
Gammaproteobacteria	Ralstonia_f	<i>Cupriavidus</i>						1										1
	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>									1	1						2
	Enterobacteriaceae	<i>Morganella</i>				1												1
	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>					1								1		1	3
	Xanthomonadaceae	<i>Tahibacter</i>														1		1
	<i>Pseudoxanthomonas</i>		1	1	2					1		1			1		7	

Abbildung 58: Auftreten abundanter, auf DEV-Agar kultivierter Bakterien aus Aquarienwasserproben zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten in den Versuchsanlagen, Fütterungsversuch 3. Anzahl analysierter Isolate in den Anlagen: EE: 41, RO: 39, SB: 49. Die Zuordnung erfolgte über eine BLAST-Analyse der 16S rRNA Gensequenzen in der Typstammdatenbank EzTaxon (Kim et al. 2011). EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosroseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Ein Vergleich bewachsener Agar-Platten (Verdünnungsstufe  $10^{-1}$ ) vor und nach der Blutfütterung zeigte eine deutliche Veränderung (mehr Kolonien pro Agar-Platte) bei der RO-Anlage. Insbesondere die Konzentration von kleinen orangen Kolonien mit glattem Rand hat nach der Blutfütterung zugenommen. Diese wurden als *Chryseobacterium* ssp. identifiziert. Die EE-Anlage zeigte keine Veränderung der abundanten wasserassoziierten auf DEV-Agar kultivierten Bakterien (Abbildung A7).

### **3.1.8.6 Sterberaten und Gewichte der Blutegel in Fütterungsversuch 3**

Die Sterberaten bei den Blutegeln lagen vor der Fütterung bei maximal 1%. Kurz vor der Fütterung starb in der RO-Anlage eine relevante Anzahl an Blutegeln. Dieses Sterben setzte sich fort, am 18.10.2014 waren in der RO-Anlage rd. 44% (657 Blutegel) der Tiere gestorben (Tabelle 16, Abbildung 59). Daher wurde der Versuch in der RO-Anlage abgebrochen. Bis zum 15.11.2014 starben in den beiden verbliebenen Anlagen in etwa gleich viele Blutegel. Ab diesem Datum stieg die Sterberate in der EE-Anlage ebenfalls stark an. Auch der Versuch in der EE-Anlage wurde daher am 10.01.2015 abgebrochen, bis hierhin waren in der EE-Anlage rd. 40,5% (607 Tiere) gestorben (Abbildung 60). Bis zum Versuchsende am 23.02.2015 starben in der SB-Anlage rd. 19,5% (292 Blutegel) (Abbildung 61). Abbildung 63 zeigt den Verlauf des Sterbens in den Anlagen kumuliert.

Tabelle 16: Sterberaten (%) und Anzahl der gestorbenen Blutegel in den Anlagen des Fütterungsversuchs 3 vor und nach der Fütterung (18.10.2014) (Mittelwerte und Standardabweichung SD der drei parallel analysierten Aquarien). Wegen der hohen Sterberate in der RO-Anlage wurde diese außer Betrieb genommen. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Sterberaten	EE-Anlage	RO-Anlage	SB-Anlage
Vor Fütterung	0 Stk.	18 Stk.	0 Stk.
SD	0	1	0
Vor Fütterung	0%	1%	0%
SD	0	0	0
Nach Fütterung	40 Stk.	657 Stk.	46 Stk.
SD	1	12	1
Nach Fütterung	2%	44%	3%
SD	2	4	2

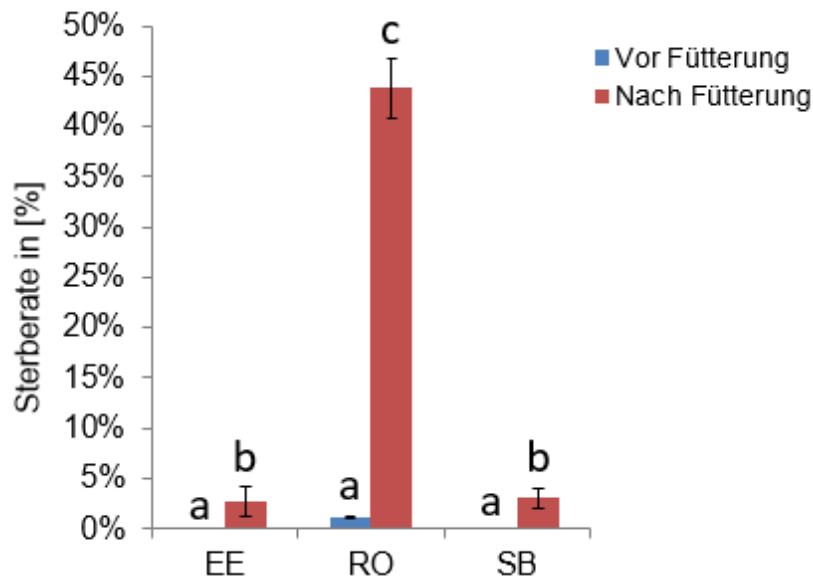


Abbildung 59: Sterberaten (in %) der Blutegel je Anlage vor und nach der Blutfütterung in Fütterungsversuch 3. Die Sterberaten der Blutegel aus den Anlagen mit verschiedenen Wasserbehandlungen bis zum 18.10.2014 wurden mittels Multivarianzanalyse statistisch verglichen (ANOVA-Analyse mit Tukey Test; SigmaPlot, SYSTAT); unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ . Mittelwerte und Standardabweichungen beruhen auf den Werten der drei parallel untersuchten Aquarien je Anlagenvariante. Zum Zeitpunkt dieser Auszählung wurde die RO-Anlage außer Betrieb genommen. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

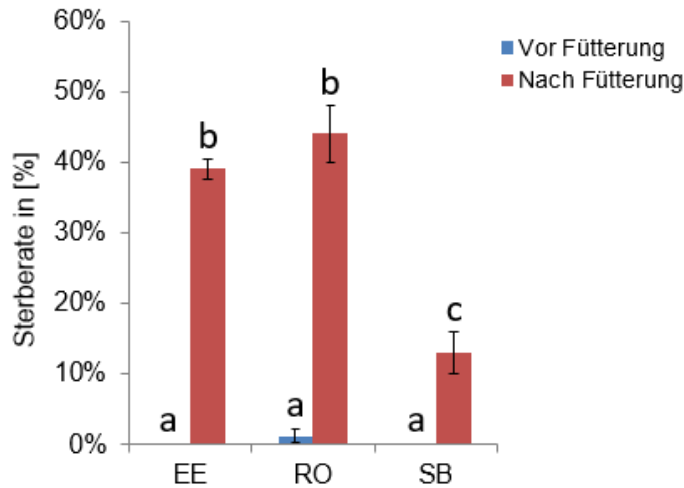


Abbildung 60: Sterberaten (in %) der Blutegel je Anlage vor und nach der Blutfütterung in Fütterungsversuch 3. Die Sterberaten der Blutegel aus den Anlagen mit verschiedenen Wasserbehandlungen bis zum 10.01.2015 wurden mittels Multivarianzanalyse statistisch verglichen (ANOVA-Analyse mit Tukey Test; SigmaPlot, SYSTAT); unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ . Mittelwerte und Standardabweichungen beruhen auf den Werten der drei parallel untersuchten Aquarien je Anlagenvariante. Zum Zeitpunkt dieser Auszählung wurde die EE-Anlage außer Betrieb genommen. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

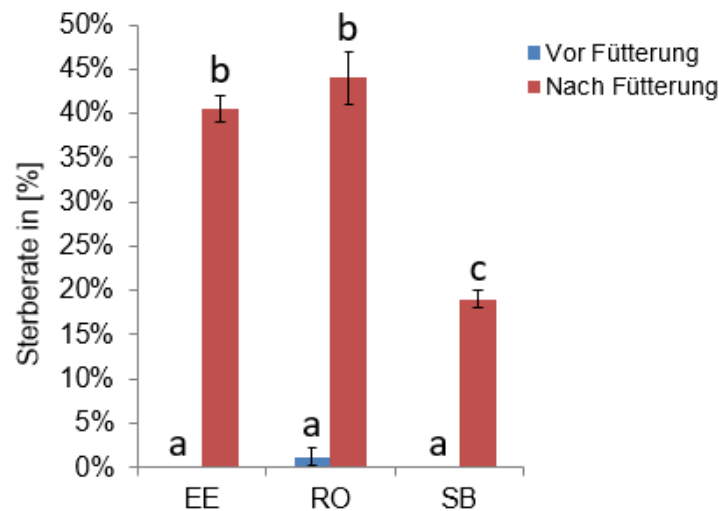


Abbildung 61: Sterberaten (in %) der Blutegel je Anlage vor und nach der Blutfütterung in Fütterungsversuch 3. Die Sterberaten der Blutegel aus den Anlagen mit verschiedenen Wasserbehandlungen bis zum 23.02.2015 wurden mittels Multivarianzanalyse statistisch verglichen (ANOVA-Analyse mit Tukey Test; SigmaPlot, SYSTAT); unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ . Mittelwerte und Standardabweichungen beruhen auf den Werten der drei parallel untersuchten Aquarien je Anlagenvariante. Auszählung der SB-Anlage wurde zum Versuchsende vorgenommen. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Die Blutegel aller Anlagen zeigten eine signifikante Gewichtszunahme zwischen Beginn und Ende des Versuches. Zwischen den Anlagen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die höchste Gewichtszunahme, auf 250 Blutegel bezogen, zeigte sich bei der RO-Anlage mit 256 g Gesamtgewichtszunahme. Die anderen beiden Anlagen zeigten Gewichtszunahmen von 217,9 g bei der SB-Anlage und 218,1 g bei der EE-Anlage (Tabelle 17, Abbildung 62).

Tabelle 17: Gewicht von 250 gesunden Blutegeeln zu Beginn und Ende des Fütterungsversuchs 3, gelistet für die einzelnen Anlagen sind Mittelwert und Standardabweichung SD für je drei parallel geführte Aquarien; Datum der Auswiegung: 17.10.2014. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Gewichte (g)	EE-Anlage	RO-Anlage	SB-Anlage
Besatz	168,3 g	168,3 g	168,3 g
SD	0 g	0 g	0 g
Bei Auswiegung	386,4 g	424,3 g	386,2 g
SD	15,6 g	99,0 g	18,1 g

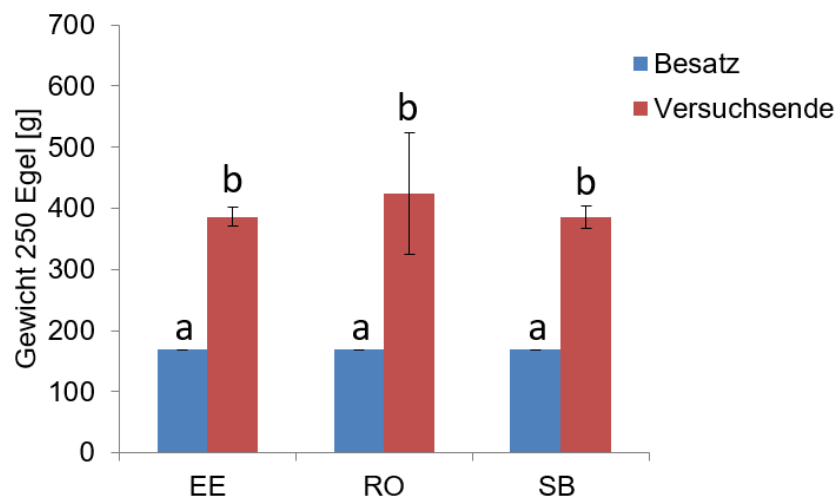


Abbildung 62: Gewichte von 250 gesunden Blutegeeln zu Beginn und Ende des Fütterungsversuchs 3. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweils drei Aquarien pro Anlage. Statistische Auswertung erfolgte jeweils zwischen den Anlagen bei Besatz und zum Versuchsende (ANOVA-Analyse mit Tukey Test) wurde in SigmaPlot (SYSTAT) durchgeführt; unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $P \leq 0,05$ . Mittelwerte und Standardabweichungen beruhen auf den Werten von drei parallel geschalteten Aquarien je Anlage. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Alle Bluteigel waren bei Versuchsbeginn im gleichen Fütterungsstadium, die letzte Fütterung lag ca. drei Monate zurück. In den Anlagen waren aber große Unterschiede in der Bereitschaft zur Futterraufnahme zu sehen (Tabelle 18). In der EE- und der SB-Anlage fraßen mit 99,2% (EE-Anlage) bzw. 99,4% (SB-Anlage) fast alle Bluteigel. Dagegen wollten in der RO-Anlage nur 94% der Tiere Blut aufnehmen (Abbildung 65). Dies korrelierte mit dem Verhalten der Bluteigel, die in der RO-Anlage die deutlichsten Anzeichen von Unwohlsein zeigten. Auch der frühe Beginn des Sterbens großer Anzahlen von Bluteigeln und die hohe Sterberate in der RO-Anlage passen hiermit zusammen.

Tabelle 18: Anzahl und Rate (%) der Bluteigel, die bei der Fütterung in Fütterungsversuch 3 nicht gefressen haben, aufgeteilt nach Aquarien und je Anlage zusammen gefasst. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Anlage	Aquarium 1	Aquarium 2	Aquarium 3	Gesamt Stk.	% gesamt
EE-Anlage	3 Stk.	4 Stk.	5 Stk.	12 Stk.	0,8%
RO-Anlage	20 Stk.	35 Stk.	33 Stk.	88 Stk.	6%
SB-Anlage	5 Stk.	3 Stk.	1 Stk.	9 Stk.	0,6%

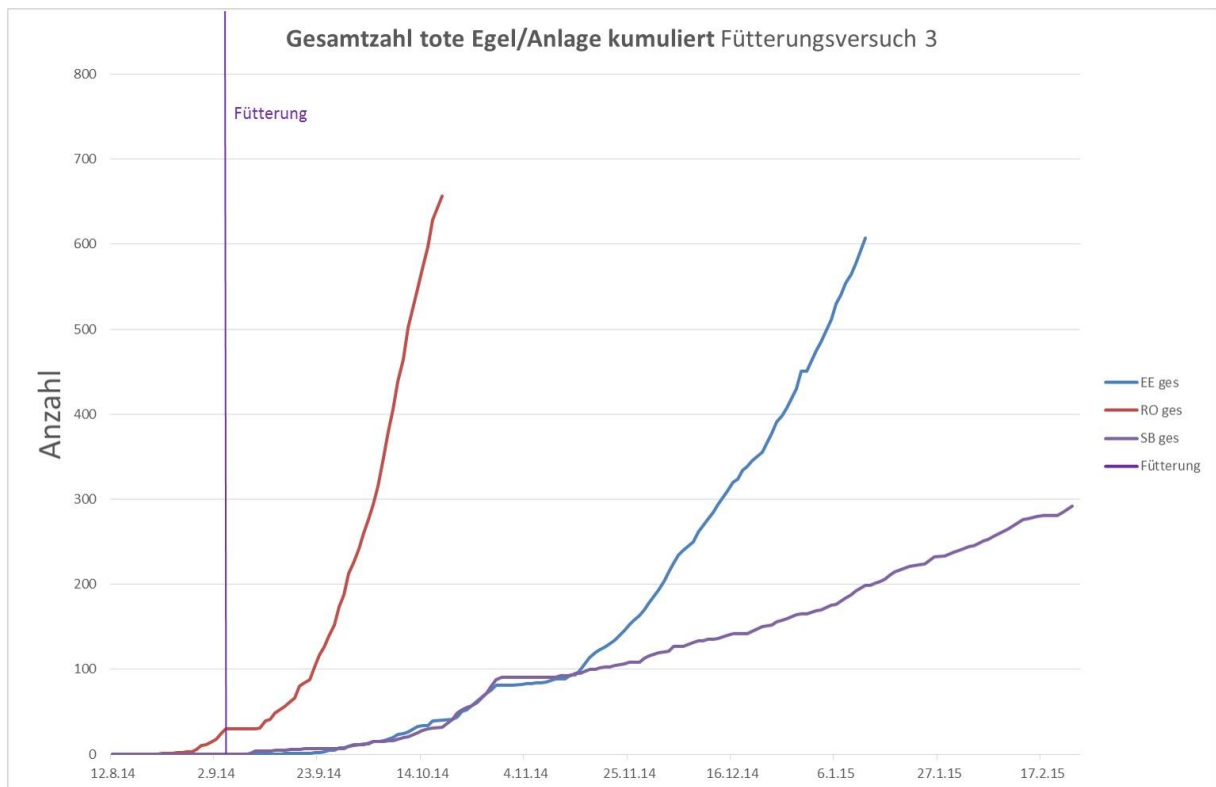


Abbildung 63: Verlauf und Anzahl der in Fütterungsversuch 3 verstorbenen Blutegel nach Anlagen, kumuliert. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Am 17.10.2014 wurden die überlebenden Blutegel aus den Anlagen gezählt und gewogen. Der Zeitpunkt wurde mit dem gleichen zeitlichen Abstand zur Fütterung festgelegt wie bei Fütterungsversuch 1, um einen Vergleich zu ermöglichen. Bei den Gewichten je Blutegel zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anlagen (Abbildung 64, Tabelle 19).

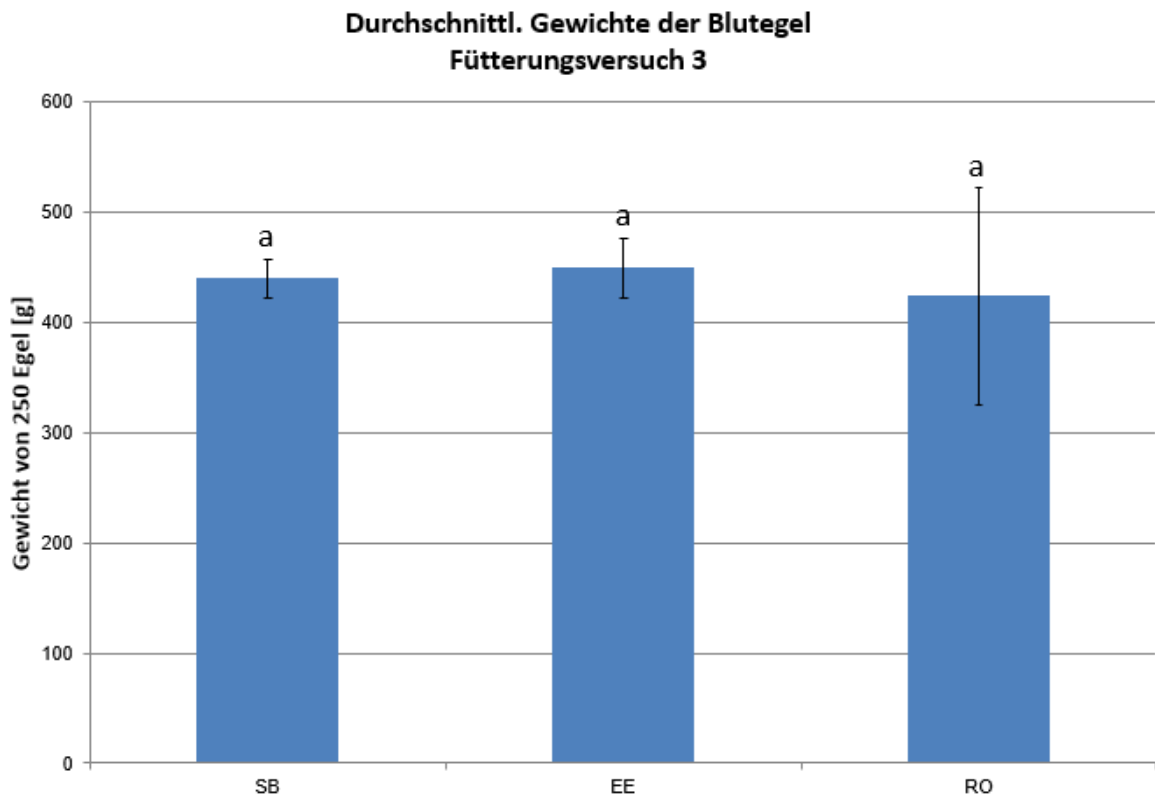


Abbildung 64: Auswertung Durchschnittsgewichte von 250 Bluteigeln am 17.10.2014 in den Anlagen mit Standardabweichung, Fütterungsversuch 3; unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede,  $P \leq 0,05$ . Mittelwerte und Standardabweichungen beruhen auf den Werten von drei parallel geschalteten Aquarien je Anlage. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Tabelle 19: Gewichtszunahme der Bluteigel nach Anlagen, Fütterungsversuch 3. Werte beziehen sich auf 250 Bluteigel bzw. geben ein Durchschnittsgewicht an (g). EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Bluteigelgewicht	Startgewicht	Endgewicht	Gewichtszunahme	Mittelgew./Egel
EE-Anlage	168,26 g	449,81 g	281,54 g	1,13 g
RO-Anlage	168,26 g	424,34 g	256,06 g	1,02 g
SB-Anlage	168,26 g	439,82 g	271,54 g	1,09 g

Die Betriebssteuerung der drei Anlagen hinsichtlich Temperatur, pH, Filterstabilität sowie Hydraulik ist insgesamt zuverlässig verlaufen. Im Fütterungsversuch 3 gab es keine technisch bedingten Kalamitäten.

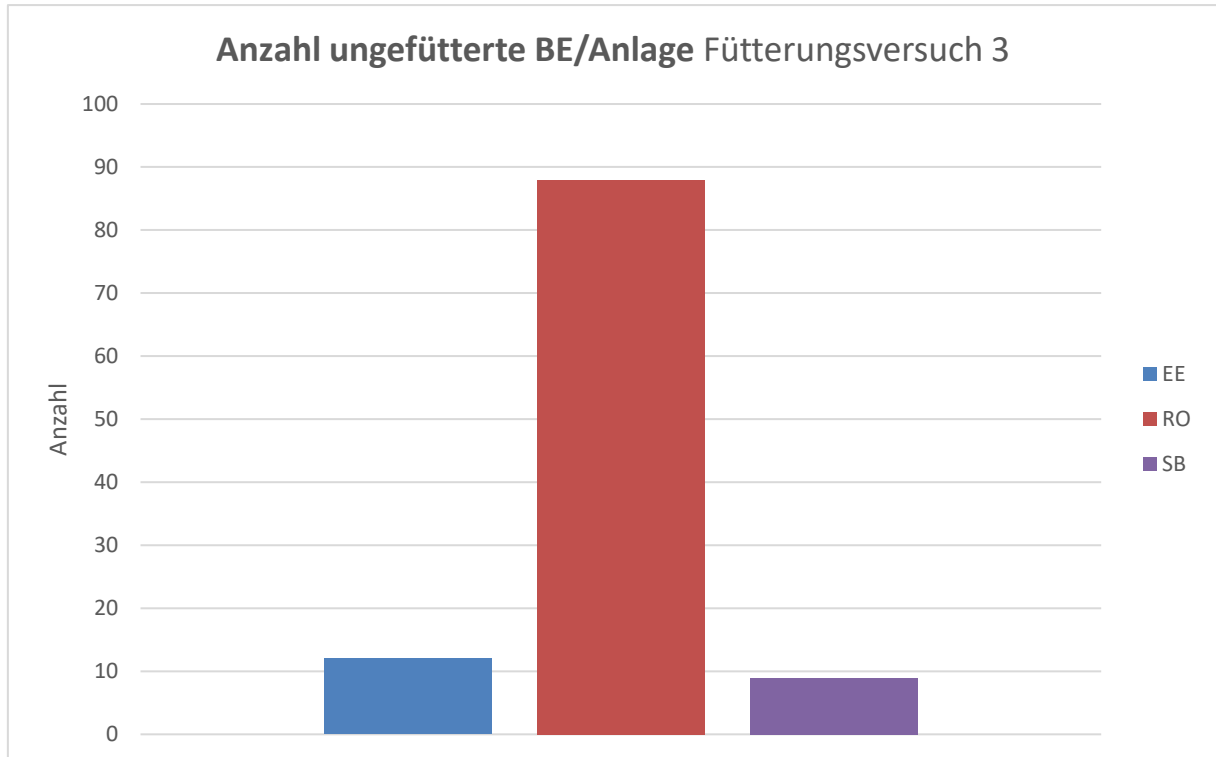


Abbildung 65: Darstellung der Anzahl Bluteigel, die keine Nahrung aufgenommen haben, Fütterungsversuch 3; Zahlen wurden je Anlage aus drei Aquarien kumuliert.  
EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

### 3.1.8.7 Zusammenfassung der Ergebnisse aus Fütterungsversuch 3

Verfahrenstechnisch funktionierten die Anlagen problemlos, alle Komponenten arbeiteten zuverlässig. Die verwendeten Filter waren in der Lage, innerhalb kurzer Zeit Ammonium zu Nitrit und Nitrit zu Nitrat zu oxidieren. Nitrat kumulierte und daher mussten insbesondere nach der Fütterung Wasserwechsel durchgeführt werden. Bei den Blutekeln konnte die stark erhöhte Sterblichkeit und das schlechte Fressverhalten in der RO-Anlage in Fütterungsversuch 2 repliziert werden. Nicht repliziert werden konnte das Ergebnis aus dem Pilotversuch, das ungewöhnlich große und gesunde Tiere bei der Haltung in Eichenextraktwasser ausgewiesen hatte, auch wenn die Überlebensrate in Fütterungsversuch 1 keinen Vorteil dieser Wasserbehandlung belegte. Da als Hauptparameter die Überlebensrate und die Gesundheit der Blutekel herangezogen wurde, scheinen die beiden Systeme mit niedrigem pH in der untersuchten technischen Gestaltung als generelle Haltungsform nicht geeignet. Die SB-Anlage konnte die chemische Wasserqualität dagegen in einem Bereich halten, der für die Blutekel offenbar nicht abträglich war.

Zu Beginn des Versuches waren alle eingesetzten Blutekel gesund. Da die pH-Werte in den RO- und EE-Anlagen in den ersten Wochen des Experimentes langsam abgesenkt wurden, war kein auffälliges Unwohlsein der Blutekel zu beobachten. Zu sehen war, dass die Blutekel in diesen Anlagen teilweise für wenige Tage das Wasser verließen. Die Blutekel konnten sich bei dieser Anlagenführung besser an den pH adaptieren als in Fütterungsversuch 2. Starke pH-Wert-Schwankungen wurden durch automatisierte Steuerungen vermieden. Das wiederum führte zu deutlich weniger Stress bei den Blutekeln und zu einem sichtbar besseren Gesundheitszustand als bei Fütterungsversuch 2. Die Sterberaten in den EE- und SB-Anlagen waren vor der Blutfütterung gleich Null. Die Blutekel hatten bei der Fütterung das Blut gut aufgenommen. Erbrechen von Fütterungsblut zeigte sich wenige Tage nach der Blutfütterung in allen Anlagen. Die Zunahme der Konzentration kultivierbarer Bakterien im Aquarienwasser war durch die Fütterung weniger stark beeinflusst als in Fütterungsversuch 2. Nach der Blutfütterung stieg die Sterberate der Blutekel in allen Anlagen signifikant an, war aber, mit Ausnahme der RO-Anlage, relativ gering. Die Gewichtszunahme pro gesundem Blutekel war in der RO-Anlage am größten, allerdings zeigten die Gewichte der gesunden Blutekel bei der Auszählung zwischen den Anlagen keine signifikanten Unterschiede.

Die Zunahme der Konzentration kultivierbarer Bakterien beruhte bei den verschiedenen Behandlungssystemen generell auf der Veränderung der relativen Abundanz einzelner wasserassoziierten Bakteriengruppen, z.B. den Chryseobakterien.

Die Fütterungstechnik, die ein Belassen der Bluteigel in den Aquarien, wenn auch mit stark reduziertem Wasserstand beinhaltet, bedeutet erkennbar weniger Stress für die Tiere, da sie nicht gefangen werden mussten und sich die physikalische und chemische Wasserqualität bis zur Fütterung nicht wesentlich ändert. Erst mit der Vermischung des Aquarienwassers mit Fütterungsblut ändert sich dies, führt aber nicht zu erkennbarem Stress für die Tiere.

## 4 Diskussion

Die gewerbsmäßige Blutegelvermehrung findet in der westlichen Welt erst seit einigen Jahren statt. Nur eine kleine Zahl von Betrieben befasst sich mit der „Herstellung“ dieses Arzneimittels, therapeutisch werden überwiegend aus der Natur entnommene Blutegel eingesetzt. In Deutschland bietet ausschließlich eine Firma (bbez) legal Zuchtegel an. Im Jahr 2015 wurden von der bbez 350.000 Tiere verkauft, davon waren nur rd. 20% (rd. 70.000) Zuchtegel, 80% waren importierte Tiere (rd. 280.000 Blutegel). Der zweite deutsche Anbieter (Animalpharma GmbH, Weismain) hat im Jahr 2015 rd. 122.000 Tiere verkauft, ausschließlich importierte Wildtiere. Dem deutschen Markt standen somit 402.000 Importegel und 70.000 Zuchttiere zur Verfügung (Zahlen aus Angaben der beiden Firmen). Im Zusammenhang mit der Einstufung der Tiere als Fertigarzneimittel steigen die Ansprüche an die Sicherheit des Arzneimittels deutlich an, hinzu kommt die Forderung der Zulassungsbehörde, dass die Hersteller in absehbarer Zeit nur noch gezüchtete Blutegel anbieten sollen (siehe 1.1). Eine vollständige Kontrolle des komplexen „Herstellungsprozesses“ wird in diesem Zusammenhang wichtiger, ebenso die Wirtschaftlichkeit. Nur in intensiver Haltung können Blutegel wirtschaftlich hergestellt werden, den Bedarf mit Tieren zu decken, die aus der Natur entnommen wurden, wäre nicht nachhaltig, zumal die Bestände regional durchaus stark schwanken können. Dies führt, wie beispielsweise zurzeit in Serbien, zu Fangverboten durch die Naturschutzbehörden. Die natürlichen Bestände in den Donau- und Save-Einzugsgebieten Serbiens galten lange als unerschöpflich. Somit dient die Herstellung von Blutegeln für den medizinischen Bedarf in Zuchtbetrieben auch dem Arterhalt.

Untersuchungen oder Veröffentlichungen, die sich umfassend mit den Lebensbedingungen von *H. verbana* in Intensivhaltung befassen, existieren nicht. Untersuchungen von Wilkin & Scofield (1991) zeigten, dass wild lebende Blutegel nur sehr langsam an Gewicht zulegten und nur wenige Tiere in dem Beobachtungszeitraum trächtig wurden. 79% der überwachten Blutegel konnten geringfügig an Gewicht zulegen, 39% verloren hingegen Körpermasse. Es kann daher nicht vom Gewicht resp. der Größe eines Blutegels auf sein Alter geschlossen werden. Ein Grund für das Wachstumsverhalten der Wildegel ist vermutlich, dass diese nicht immer dann einen passenden Wirt finden, wenn sie die nächste Blutmahlzeit aufnehmen könnten, also wieder hungrig sind. Dagegen wurde den Tieren im Fütterungsregime immer dann Futter angeboten, wenn ihr Verhalten auf Hunger hindeutete. Im Maximum erreichte ein mit Rinderblut gefütterter *H. medicinalis* 300 Tage nach dem Schlüpfen rd. 29 Gramm (Wilkin & Scofield 1991). Davies & McLoughlin (1996) erzielten mit regelmäßigen Fütterungen alle 30-32 Tage Zuwächse von Fütterung zu Fütterung, was sich unmittelbar auf die Wirtschaftlichkeit auswirkt,

wenn eine relevante Anzahl von Blutegeln die Fütterungen und Haltung gesund absolviert. Ein Fütterungsregime, das den Haltungsbedingungen angepasst ist, kann das Wachstum der Blutegel stark beschleunigen. Mit einem Fütterungsregime einher gehen Fütterungen immer dann, wenn die Blutegel wieder Nahrung aufzunehmen bereit sind, die Tiere fressen also deutlich häufiger, als sie das im natürlichen Habitat können, wenn auch die aufgenommene Masse an Blut pro Mahlzeit niedriger ist als bei Tieren, die schon lange hungern (Davies & McLoughlin 1996). Da Blutegel erst ab einem bestimmten Gewicht (bei *H. medicinalis* rd. 3-13 Gramm) Kokons produzieren können (Davies & McLoughlin 1996; Wilkin & Scofield 1991), (eigene Untersuchungen an *H. verbana* decken sich hiermit) reduziert sich mit einem Fütterungsregime auch die Zeit bis zur ersten und weiteren Kokonablagen (Davies & McLoughlin 1996).

Blutegel sind nur auf den ersten Blick anspruchslose Tiere, ihre Haltung und Vermehrung bedarf vor allem anderer Verfahren als sonstige aquatische Lebewesen, auch wenn diese ebenfalls hohen Qualitätsanforderungen genügen müssen, wie beispielsweise Speisefische. Da zu den Ansprüchen von Blutegeln an die Wasserqualität keine eingehenden Untersuchungen existieren, wurde auf Angaben zu Fischen zurückgegriffen. In der Literatur finden sich folgende Daten zu den Ansprüchen von Fischen an die chemische Wasserqualität (Tabelle 20):

Tabelle 20: Minimalansprüche von Fischen an die Wasserqualität, ausgewählte Parameter (Wildgoose 2001; El-Shafai et al. 2004).

Parameter	Grenzwert	Bemerkung
Ammonium NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0 mg/l	pH-abhängig
Nitrit NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<0,1 mg/l	pH-abhängig, temperaturabhängig
Nitrat NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<50 mg/l	
Sauerstoffgehalt	100% Sättigung	Mindestens 6 mg/l

Typischerweise steigt bei der Blutegel-Haltung nach einer Fütterung die Konzentration von Ammonium ( $\text{NH}_4^+$  bis ca. 7,5 mg/l), etwas zeitversetzt die von Nitrit ( $\text{NO}_2^-$  bis ca. 5,5 mg/l) steil an. Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) konzentrierte sich trotz (Teil-)Wasserwechsel im Versuchsverlauf sukzessive bis über 200 mg/l auf (Abbildungen 20, 25, 33 und 52), die Konzentration nahm in Fütterungsversuch 3 dann aber auch wieder ab, ohne dass klar ist, wo der Abbau stattfindet (Abbildung 52). Die jeweiligen Konzentrationen im Wasser lagen wenige Tage nach der Fütterung deutlich über den für Fische akzeptablen Konzentrationen. Biologische Filter benötigen einige Wochen, um eine ausreichende Reinigungsleistung zu haben (Fitzgerald et al. 2015; Hall 1999). In den Perioden zwischen den Blutegelfütterungen, die bis zu mehreren Monaten dauern, können die Mikroorganismen in den Filtern mangels Nahrung teilweise wieder absterben und stehen bei einem nächsten Konzentrationsanstieg nach einer Blutegelfütterung nicht mehr in wirkungsvoller Abundanz zur Verfügung. Die Fütterung der Filterbakterien mittels einer Ammoniumverbindung als Vorbereitung für den nach der Blutegelfütterung entstehenden Konzentrationspeak bei Ammonium hat sich als machbar und zielführend erwiesen, diese Technik wurde in der Produktion der bbez etabliert.

In Biofiltern, die in aquaristischen Kreislaufsystemen (RAS) für die Fischzucht eingesetzt werden, wurden überwiegend Ammonium oxidierende Archaeen (AOA) gefunden (Fernandez-Guerra et al. 2012). Bei Untersuchungen in den Filtern des Fütterungsversuchs 3 konnten keine Archaeen, lediglich Ammonium oxidierende Bakterien detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass bei der Blutegelhaltung andere chemische Verhältnisse im Haltungswasser vorherrschen als bei der Fischhaltung. *Nitrospira* zeigten in den Filtern der Fütterungsversuchs 3 die größte relative Abundanz (Tabelle A4).

Neuere wissenschaftliche Untersuchungen haben gezeigt, dass bestimmte *Nitrospira* nicht, wie bisher angenommen, die Nitrifikation zwangsläufig in zwei separaten Schritten durchführen, sondern in der Lage sein können, Ammonium direkt zu Nitrat zu oxidieren (Daims et al. 2015).

Die mikrobiologischen Untersuchungen zeigten, dass die unterschiedlichen Wasserbehandlungssysteme einen Effekt auf die Abundanz und Zusammensetzung der wasserassoziierten Bakteriengemeinschaften hatten. Im Vergleich zu dem Fütterungsversuch 1 waren die Schwankungen beim Fütterungsversuch 3 weniger stark. Die Blutfütterung führte bei den unterschiedlichen Behandlungssystemen zu zeitlich unterschiedlichen Effekten. Diese Unterschiede müssten in einem weiteren Schritt z. B. mit dem Erbrechen der Blutegel oder mit Veränderung anderer Wasserparametern (etwa Ammonium- oder Nitrit-Konzentrationen) korreliert werden um sie erklären zu können.

Die hohe Mortalitätsrate bei den Blutekeln nach Fütterungen wurde anfangs, im Rückgriff auf Untersuchungen bei Fischen, auf die erhöhte Konzentration der Stickstoffverbindungen im Haltungswasser zurück geführt. Daher war der erste Ansatz zur Reduzierung der Mortalität die Aufbereitung des Haltungswassers mittels verschiedener Wasserreinigungstechniken und somit die Verhinderung starker Konzentrationsanstiege bei den N-Produkten. Die eingesetzten Techniken zeigten unterschiedliche biologisch-chemische Reinigungsleistungen und -dynamiken. Eine Ammonium- und nachfolgende Nitritoxidation wurde sowohl in der RO- als auch der SB-Anlage in Gang gebracht und konnte stabil geführt werden (3.1.8.2). Allerdings zeigt sich bei den Blutekeln nach der Fütterung eine erhöhte Anzahl von Einschnürungen, die gemeinhin mit Erkrankung in Verbindung gesetzt werden (Michalsen & Roth 2012). Mit der Abnahme der Ammonium- und Nitritkonzentrationen in den Aquarien nahm auch die Anzahl der Einschnürungen wieder ab, ein großer Teil verschwand wieder vollständig.

Dass die Blutekel deutlich höhere Konzentrationen aller drei genannten N-Verbindungen tolerieren, ohne Anzeichen von Unwohlsein zu zeigen, ergaben später eigene Versuche. Hierdurch rückte bei der Suche nach den Gründen für die Ausfälle die egelassozierte und wasserassozierte Mikrobiologie in den Fokus.

Kritisch ist bei der Aufzucht der Blutekel insbesondere die Zeit nach der Fütterung, wobei die ersten beiden Fütterungen meist besser vertragen werden als weitere Fütterungen und es nur wenige Ausfälle (Versterben, Erkranken) gibt. Die Blutekel scheiden Verdauungsprodukte, überwiegend Stickstoffverbindungen, aus und erbrechen öfter Teile ihrer Blutmahlzeit. Im Haltungswasser werden nur vier Substanzen in erheblichem Umfang gefunden, die Ausscheidungsprodukte der Blutekel sind: Kohlendioxid, Ammonium, Harnstoff ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) sowie Stoffe aus dem Abbau des Blutpigments (Lotz et al. 1970). Es wurde davon ausgegangen, dass diese Substanzen das Wohlbefinden der Blutekel beeinträchtigen und ihr Immunsystem belasten. Orientiert man sich an den oben genannten Werten für Speise- und Zierfische, sind die Haltungsbedingungen bei Blutekeln zumindest kurzzeitig, insbesondere nach Fütterungen, regelmäßig ungenügend. Darüber hinaus fördert (erbrochenes) Blut im Wasser bestimmte wasserassozierte Bakterien, die eventuell egelpathogen sind. Mikrobiologische Untersuchungen zeigen, dass sich die Bakterienpopulationen im Zusammenhang mit der Blutfütterung ändern. Es ist davon auszugehen, dass die genannten Faktoren, insbesondere in ihrer Addition, das Immunsystem der Blutekel relevant belasten. Auch der Fütterungsvorgang selber erscheint problematisch, da die Simulation eines Saugvorgangs aus lebendem Gewebe mit toten Materialien technisch schwierig zu realisieren ist. Dies kann zu einer zu großen Aufnahme von Fütterungsblut und

letztlich zu den genannten Problemen führen. Eine daran angepasste Fütterungstechnik zu entwickeln erscheint daher als wichtige Aufgabe für die Zukunft.

Betrachtet man die genannten Substanzen bei der Blutegelhaltung separat, zeigen sich die Blutegel sehr viel widerstandsfähiger als Fische. Eigene Versuche ergaben, dass Blutegel selbst nach zwei Monaten bei stark erhöhten Konzentrationen von Ammonium (100 mg/l), Nitrit (50 mg/l) und Nitrat (400 mg/l) im Haltungswasser keine Anzeichen von Unwohlsein oder gar Erkrankung zeigen. Kommen solche (auch niedrigere) Spitzen aber in Kombination und zusätzlich mit entsprechender mikrobiologischer Situation zusammen, reagieren die Blutegel mit Zeichen für Unwohlsein, Erkrankung oder Tod. Die Ursachen für die Erkrankungen der Blutegel scheinen daher multifaktoriell zu sein. Eine gute Wasserqualität, die weitgehend frei von Stickstoffprodukten ist und zusätzlich eine möglichst geringe Abundanz von Bakterien aufweist, welche zusammen mit der Blutfütterung verstärkt auftreten können, fördert vermutlich die Gesundheit der Blutegel und führt zu besseren Überlebensraten. Der Einfluss der Stickstoffverbindungen alleine wurde vermutlich, in Ableitung aus der Fischzucht, überschätzt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche haben gezeigt, dass übergreifende, kombinierte Wasserconditionierungen, die sowohl die physikalisch-chemische als auch die mikrobiologische Situation in den Haltungsgefäßen berücksichtigen, zu einer relevanten Verbesserung der Überlebensraten der Blutegel führen können.

Der Pilotversuch ergab Hinweise darauf, dass Blutegel ein leicht saures Wasser bevorzugen und darin gesünder sind. Das deckt sich auch mit Hinweisen in der Literatur (Michalsen & Roth 2012; Kuppe 1977; Cesur 2009). Diese Bevorzugung leicht sauren Wassers konnte in den weiteren Versuchen nicht bestätigt werden, weder Zugabe von Eichenextrakt noch die Einbringung von CO<sub>2</sub> führte zu einem positiven Effekt hinsichtlich der Gesundheit der Tiere, obwohl sich die Bakterienpopulationen durchaus veränderten. Eigene Untersuchungen der Wasserzusammensetzung in vier natürlichen Habitaten im Donaugebiet und an der Save zeigten, dass dort pH-Werte zwischen 7,3 und 8,6 vorlagen (Tabelle A1). Das in der bbez verwendete Trinkwasser in Biebertal ist demnach mit pH 7,55 diesbezüglich geeignet für die Haltung der Blutegel.

Die Konzentrationsschwankungen bei den verschiedenen gelösten Substanzen, welche bei den geringen Wasservolumina in den üblichen Haltungsgläsern (rd. 4 l Wasser) auftreten, sind in Kreislaufanlagen sehr stark gedämpft. Kreislaufanlagen sind daher geeignet, den Blutegeln rapide Änderungen in ihrem künstlichen Habitat (Temperatur, diverse mikrobiologische, physikalische und chemische Parameter) weitgehend zu ersparen und sie weniger durch Reinigungs- und Wartungsarbeiten an den Behältern zu stören. Die Tiere liegen in RAS über lange

Phasen ruhig am Behälterboden, möglichst versteckt. Evident ist die stark verminderte physische Störung der Bluteigel durch die stark verminderten Manipulationen an und in den Aquarien. Diese Anlagen sind auch verfahrenstechnisch mit entsprechenden Regeleinrichtungen prozessstabil zu betreiben. Selbst wenn in einem einzelnen Aquarium die Konzentration eines Stickstoffproduktes anstieg, wirkte sich das kaum auf die hydraulisch verbundenen weiteren Aquarien aus. Eingeschleifte technische Hygienisierungseinrichtungen (UV-Anlagen, Ozonisierung, Ultraschall) reduzieren die Abundanzen verschiedener Bakterien deutlich. Es besteht aber die Möglichkeit, dass solche desinfizierend wirkenden Komponenten unter Umständen egeopathogene Mikroorganismen, im Gegensatz zu den teils symbiontischen egeassozierten „Nützlingen“, fördern könnten (De Schryver & Vadstein 2014). Dieser Aspekt sollte weiter untersucht werden, ebenso wie die Möglichkeit, probiotische Organismen zu identifizieren und gezielt einzusetzen (Hai 2015; Gatesoupe 1999). Weiter untersucht werden sollte, welche Bakterien welchen Einfluss auf die Gesundheit der Bluteigel haben und welche Bakterien welche Krankheit auslösen können. Auch wurde bisher eine LC 50 oder LC 100 (Konzentration, bei der 50 bzw. 100% der Bluteigel sterben) für die Stickstoffverbindungen im Wasser nicht ermittelt.

Ebenfalls betrachtet wurden die Bedürfnisse der Bluteigel hinsichtlich ihrer Möglichkeiten, sich artgerecht zu verhalten. So ist es den Tieren in der Intensivhaltung unmöglich, sich in Gläsern und Aquarien ohne jegliche Einrichtung zu verstecken. Dies entspricht aber ihrem natürlichen Verhalten, insbesondere nach einer Mahlzeit. In solchen Behältnissen kann man sehr häufig eine Clusterbildung beobachten. Vermutlich finden sich innerhalb der Cluster nach einiger Zeit sauerstoffarme Verhältnisse. Darüber hinaus können die Bluteigel sich von ihren abgelösten Häuten nicht räumlich trennen, so dass Organismen, die die Häute zersetzen, auch verstärkt in Kontakt mit den Bluteigeln kommen und pathogen sein könnten, auch dies gilt es zu untersuchen. Evident ist die Gefahr, dass der Häutungsprozess nicht vollständig ablaufen, sich der Bluteigel also von dem abgelösten Hautschlauch nicht richtig befreien kann. Das könnte eine der Ursachen sein für umlaufende Einschnürungen, die öfter beobachtet werden (Michalsen & Roth 2012) und die Tiere für den Verkauf untauglich machen. Auch als Krankheitsauslöser oder -symptom kommen Einschnürungen in Frage. Bisher nicht untersucht ist, ob Bluteigel durch Parasiten angegriffen werden und darunter ggf. leiden.

Wie schon erwähnt, sind auf und in dem Blutegel sowie im Haltungswasser mehrere Bakterienarten zu finden. Auch Enterobakterien werden bei den Qualitätsuntersuchungen immer wieder gefunden. *Aeromonaden* und *Mucinivorans* sind Darmsymbionten des Blutegels, die das aufgenommene Blut aufschließen (Nelson & Graf 2012; Graf et al. 2013; Nelson et al. 2015). Insbesondere *Aeromonaden* sind nach Vomieren im Aquarienwasser nachgewiesen worden. Bakterien diverser Gattungen wurden im Aquarienwasser nur nach einer Blutfütterung nachgewiesen (3.1.7.4). Diese auf ihren Einfluss auf Wohlbefinden und Gesundheit der Blutegel zu untersuchen könnte Zusammenhänge offenlegen.

Im Schleim der Blutegel wurden Proteobakterien der Familien *Comamonadaceae* und *Methylphilaceae* gefunden (Ott et al. 2015), bei denen denitrifizierende Fähigkeiten beschrieben sind (Khan et al. 2002; Kalyuhznaya et al. 2009). Möglicherweise schützen sich die Blutegel so vor dem Einfluss erhöhter Nitritkonzentrationen im Wasser.

Da sich in aquatischen Systemen die Lebensräume der pathogenen Mikroorganismen und der Wirte vollständig decken, geschieht hier eine Transmission viel unmittelbarer als bei landbewohnenden Tieren (De Schryver & Vadstein 2014). Blutegel mit der angeborenen Immunantwort besitzen ein Abwehrsystem, das von Geburt an aktiv, aber nicht lernfähig ist (Storch & Welsch 2005). Etabliert ist in der Aquakultur eine präventive Gabe von Antibiotika, um die Tiere vor Infektionen zu schützen. (Aldermann & Hastings 1998; Newman 2007). Da mit dem Blutegel ein Fertigarzneimittel zur Verfügung gestellt wird und mit Resistenzbildungen bei egelessoziierten Mikroorganismen zu rechnen ist (van Alphen et al. 2014; Giltner et al. 2013; Graf et al. 2013), wird bei der Produktion von Blutegeln in der bbez kein Antibiotikum eingesetzt.

Die von den Nephridien ausgeschiedenen *Brevundimonas vesicularis*, die wohl für die Aufspaltung von Harnstoff zu Ammonium verantwortlich sind, gelten dagegen als unproblematisch hinsichtlich ihrer Pathogenität (Lotz et al. 1970). Sie konnten in unseren Untersuchungen nicht gefunden werden.

In der Aquakultur erfolgt ein wesentlicher Eintrag organischer Substanz in das Haltungswasser durch das regelmäßig verabreichte Futter, sowie verstorbene Tiere. Nicht aufgenommenes Futter und die Kadaver sind wiederum Nahrungsgrundlage für diverse Bakterien (Blancheton et al. 2013), worunter auch egelepathogene sein könnten. Diese organische Substanz fällt bei der Aufzucht von Fischen regelmäßig und kontinuierlich an, da sie entsprechend gefüttert werden. Blutegel dagegen werden in großen zeitlichen Abständen gefüttert (Tabelle 2), (Zulhisyam et

al. 2011) und geben danach über längere Zeiträume Verdauungsprodukte ab. Völlig unvorhersehbar dagegen ist die Abgabe schon aufgenommenen Blutes durch Teilerbrechen der Mahlzeit. Zusammen mit dem Erbrochenen werden auch intestinale Bakterien in das Wasser abgegeben. Hierzu gehören im Wesentlichen *Aeromonas veronii*, sowie *Morganella morganii* (Graf et al. 2013; Nelson et al. 2015; Nelson & Graf 2012). *Mucinivorans hirudinis* (*Rikenella*-artige) sind bisher nicht kultivierbar, da sie aber intestinal in den Blutegeln gefunden wurden, ist ihr Vorhandensein im Habitatwasser der Blutegel nach Vomieren anzunehmen, als Anaerobier werden sie aber nicht lange im Wasser überleben. Insbesondere bei *Morganella morganii* besteht der Verdacht, dass sie egelpathogen sein könnten und z. B. die Rotbauchkrankheit auslösen können. *Chryseobacterium* ssp. werden in Aquakulturen regelmäßig bei erkrankten Forellen in Leber, Niere und Kiemen gefunden (Zamora et al. 2012). Veröffentlichte Untersuchungen, die Egelkrankheiten mit bestimmten Organismen in Zusammenhang bringen, sind nicht bekannt.

In RAS der Aquakultur werden insbesondere *Nitrosococcus*, *Nitrospira* und *Nitrosomonas* als Ammoniumoxidierer beschrieben, die auch in den untersuchten Filtern gefunden wurden. *Nitrosomonas* war insbesondere in dem Kanisterfilter (Druckfilter) der EE-Anlage mit relativer Abundanz von 0,3% zu finden, in dem Kanisterfilter der RO-Anlage noch mit 0,7% und im Sandfilter der SB-Anlage mit 0,4%. *Nitrosococcus* fand sich nur in dem Kanisterfilter der EE-Anlage, mit 0,2% in niedriger Abundanz. *Nitrospira* hingegen wurde in allen drei untersuchten Filtern (Kanisterfilter der EE-, RO- und SB-Anlagen, sowie Sandfilter der SB-Anlage) nachgewiesen. Eine schnellere oder stärkere Ammoniumoxidation, oder auch Denitrifikation, konnten in den EE- und RO-Anlagen jedoch nicht gemessen werden. Die höhere Abundanz korreliert demnach nicht unbedingt mit der Abbauleistung der Filter.

Auf fiel, dass *Nitrosomonas* als Ammoniumoxidierer (rd. 3%), *Nitrospira* als Nitritoxidierer (rd. 5%), sowie *Bradyrhizobium* als Denitrifikant (2,3%) in den Kanisterfiltern der EE-Anlage mit relevanter Abundanz zu finden waren. *Nitrosomonas* und *Bradyrhizobium* waren die abundantesten Bakteriengattungen der jeweiligen funktionellen Gruppe in der EE-Anlage, gefolgt von der RO-Anlage und dem Kanisterfilter der SB-Anlage. *Nitrospira* war im Kanisterfilter der SB-Anlage in der größten Abundanz (7%) zu finden, gefolgt von dem Kanisterfilter der RO-Anlage (5,4%) und dem Kanisterfilter der EE-Anlage (5%). Das deutet darauf hin, dass sich diese Bakterien in saurem Milieu (ca. pH 6,5) besser vermehren können.

Alle drei Bakteriengruppen (Ammonium-, Nitritoxidierer, Denitrifizierer) sind in dem Schwimmsandfilter der SB-Anlage nur mit geringer relativer Abundanz zu finden. Das weist auf eine grundlegend andere Abbaukinetik in diesem Filter hin.

In RAS der Aquakultur, und auch in der Blutegelhaltung, entsteht Mulm (Schlamm), der sich am Boden der Aquarien absetzt. Hierin wird die nitrifizierende Aktivität von *Pseudomonas*, *Xanthomonadaceae*, *Rhodococcus* und *Shingomonas* vermutet, die in der Abwasserreinigung in Bereichen mit niedriger Sauerstoffkonzentration gefunden werden (Fitzgerald et al. 2015). Blutegel trennen sich mehrmals wöchentlich von ihrer äußeren Epidermis in Form von Hautschläuchen (Lotz et al. 1970). Diese werden relativ langsam zersetzt, sie lassen sich oft tagelang beobachten. Bei der Blutegelhaltung wird der Mulm regelmäßig entfernt, da er mit den Hautschläuchen vermischt ist. Die Blutegel ruhen oft am Boden liegend, wenn sie sich bewegen, wirbeln sie die Häute auf und diese werden eventuell von der Strömung im Aquarium erfasst und an die Trennsiebe gezogen, an denen sie hängen bleiben. Um Blutegel an der Abwanderung zu hindern, müssen Trennsiebe, die Ablaufeinrichtungen von den Haltungsbereichen trennen, sehr feinmaschig sein. Feinmaschige Siebe werden von den Hautschläuchen schnell partiell oder ganz verschlossen, so dass es dazu kommen kann, dass der Zulauf stärker ist als der Ablauf und somit das Aquarium überflutet wird. Liegen Blutegel am Boden, somit in dem Bereich, in dem sich der Mulm ansammelt, führt das zu längerem Kontakt der Blutegel mit der Bakteriengesellschaft in dem sauerstoffärmeren Milieu, in dem auch egelpathogene Bakterien vermutet werden. Da in dem Mulm mikrobielle Verhältnisse herrschen, die nicht steuerbar sind, und die abgestreiften Häute zu Störungen führen können, werden Ansammlungen von Mulm regelmäßig und für die Blutegel störungsarm abgesaugt.

Nitrat nahm im Verlauf der Fütterungsversuche in der Konzentration ab. Welche Bakterien den Nitratabbau vornehmen, lässt sich nur vermuten. Die Denitrifikation wird überwiegend von fakultativ anaeroben Bakterien, meist Proteobakterien, unter anaeroben Bedingungen durchgeführt (König et al. 2001). Pseudomonaden als Proteobakterien sind in der Lage, unter anaeroben Bedingungen Nitrat über Nitrit, Stickstoffmonoxid und Distickstoffmonoxid zu denitrifizieren (Arat et al. 2015). Pseudomonaden konnten in den Filtern aller Anlagen nur in sehr geringer relativer Abundanz nachgewiesen werden (Tabelle A4). Da der Mulm aus den Egelaquarien regelmäßig abgesaugt wird, ist ein Vorkommen der Proteobakterien hier nicht zu vermuten. Daher ist unklar, wo in den beschriebenen Anlagen die Denitrifikation stattfindet.

Der Einsatz großflächiger Trennsiebe, verbunden mit der regelmäßigen Absaugung des Mulms, stellt eine aus Betriebssicherheitsaspekten (mögliche Verstopfung mit Überlauf) und arbeitsergonomisch sichere und praktikable Lösung dar. Durch direkt nebeneinander liegende Wasserniveaus vor und hinter dem jeweiligen Sieb lässt sich der Verstopfungsgrad unmittelbar erkennen und im Bedarfsfall mittels einer Bürste leicht beseitigen. Diese Konstruktion erwies sich als betriebssicher.

Blutegel sind in der Lage, sich auf nahezu jedem Untergrund fest anzuhafeln und zu bewegen. In ein Aquarium mit Blutegeln zulaufendes Wasser muss daher im freien Auslauf eingeleitet werden, da Blutegel auch in Schläuchen und Rohren gegen die Strömung wandern können. Insgesamt soll ein zirkulierendes System mit so wenig Energie (z. B. Pumpenleistung) wie möglich betrieben werden. In drucklosen Systemen entstehen daher zwangsläufig mehrere Pumpstrecken, eine Pumpe alleine kann ein solches System nur bedienen, wenn die Raumhöhe die Nutzung der Schwerkraft (freier Auslauf) ermöglicht. Bei kompakten Systemen ist dies möglich, aber oft schwierig. In der bbez wurde daher entschieden, zwei Pumpenstrecken je Anlage einzusetzen. Da es in einem offenen, drucklosen System (mit z. B. freiem Auslauf) ohne aufwendige Volumenmessung nahezu unmöglich ist, die Förderleistung von zwei Pumpen zu synchronisieren, müssen Zwischenpuffer und Niveaumessungen bzw. -steuerungen eingebaut werden. Da es sich hierbei um einfache niveauabhängige Ein-/Aus-Schaltungen handelt, war auch das eingesetzte hydraulische System störungsunempfindlich.

Da sich die üblicherweise in den Kanisterfiltern anzutreffenden Ammonium- und Nitritoxidierer, sowie die Denitrifikanten, als K-Strategen eher langsam vermehren, sind auf bakteriellem Umbau basierende Filter (z. B. Kanisterfilter, Biofilter) von sich aus nicht geeignet, stark schwankende Konzentrationen mit hoher Abbaurate zu oxidieren oder zu reduzieren. Dazu wurden in der bbez mittlerweile Techniken entwickelt, die Filter mit einer Ammoniumverbindung aufbauend so zu füttern, dass zum Zeitpunkt des Ammoniumpeaks im Haltungswasser durch die Ausscheidungen der Blutegel der Filter schon eine hohe Leistungsfähigkeit bezüglich der Ammonium- und Nitritoxidation aufweist.

Die automatisierte Steuerung des pH-Wertes in den EE- und RO-Anlagen war in der Lage, ein stabiles Milieu herzustellen, nachdem verschiedene Modifikationen durchgeführt wurden. Hierbei spielt die Auswahl der optimalen Stelle für die Online-Messung eine besondere Rolle, um eine maximale Homogenität im Gesamtsystem zu erreichen.

## 5 Anhang

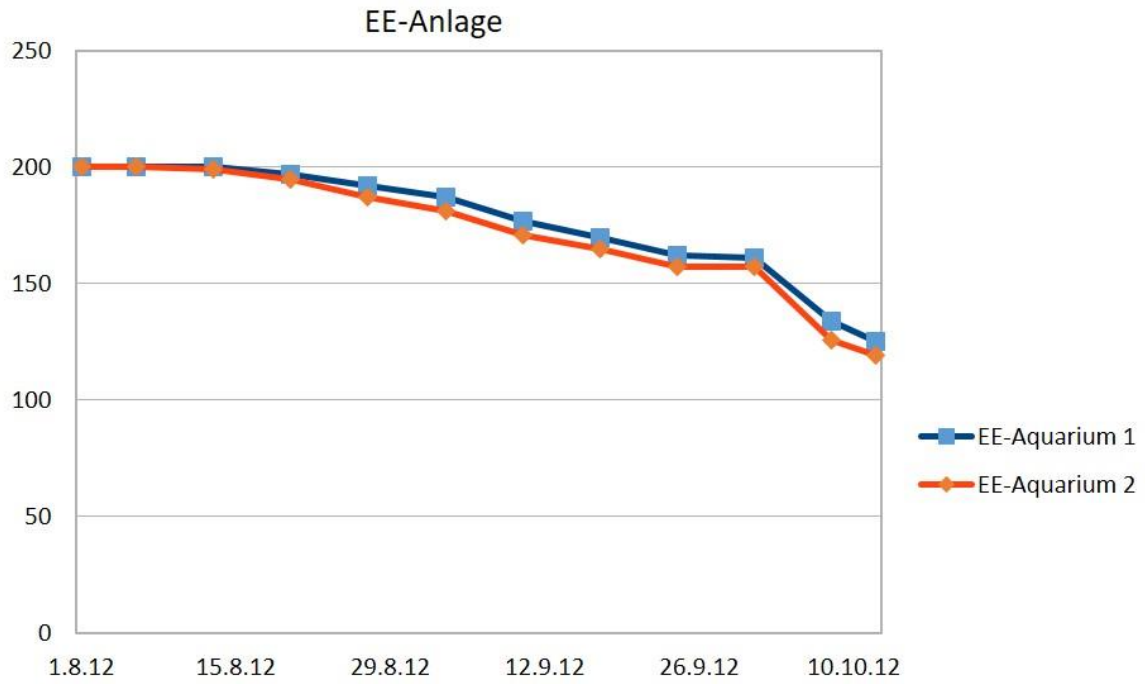


Abbildung A1: Auswertung der Blutegelzahlen in den Aquarien, EE-Anlage Pilotversuch.

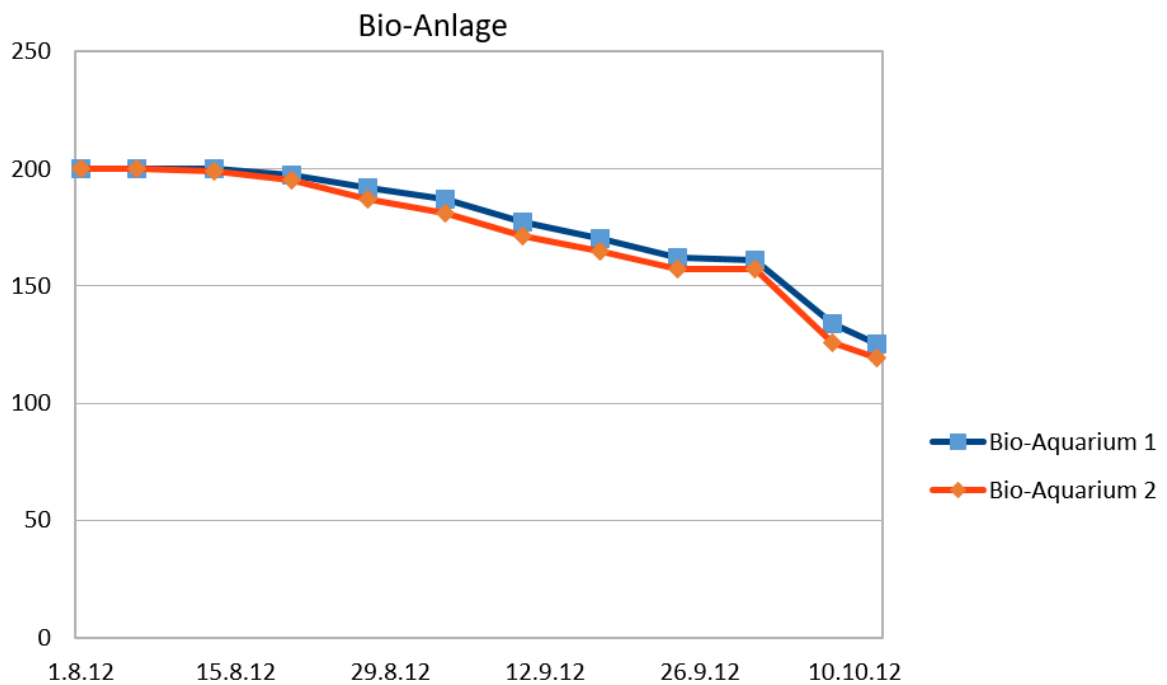


Abbildung A2: Auswertung der Blutegelzahlen in den Aquarien, Bio-Anlage Pilotversuch.

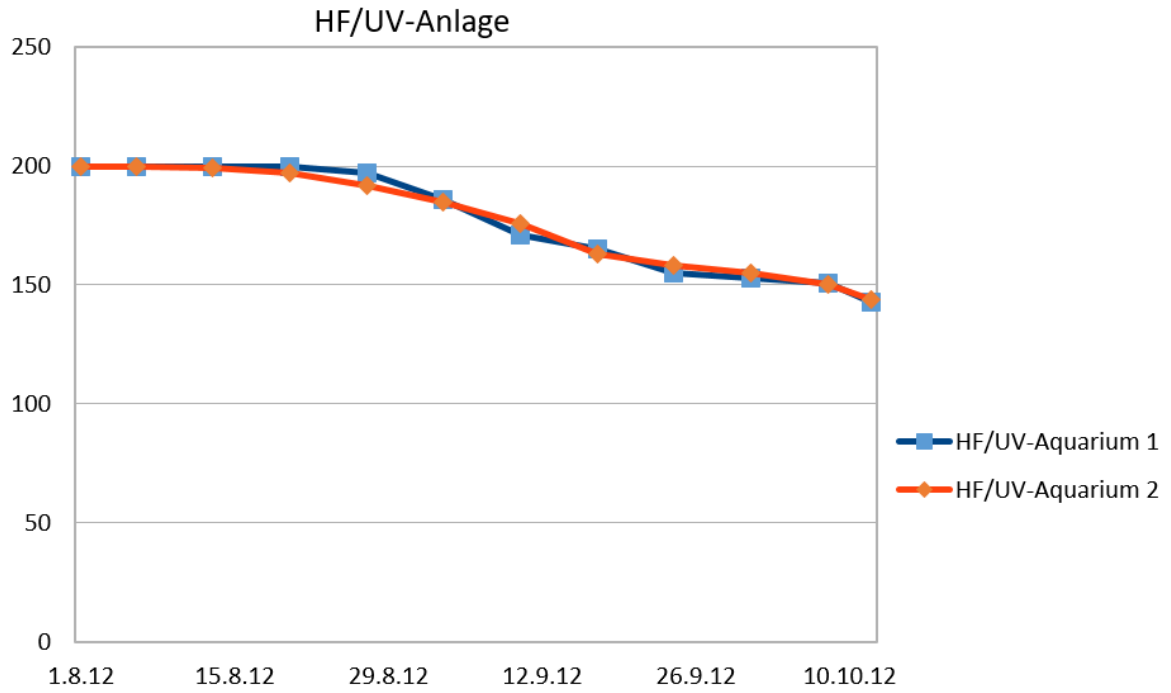


Abbildung A3: Auswertung der Blutegelzahlen in den Aquarien, HF/UV-Anlage Pilotversuch.

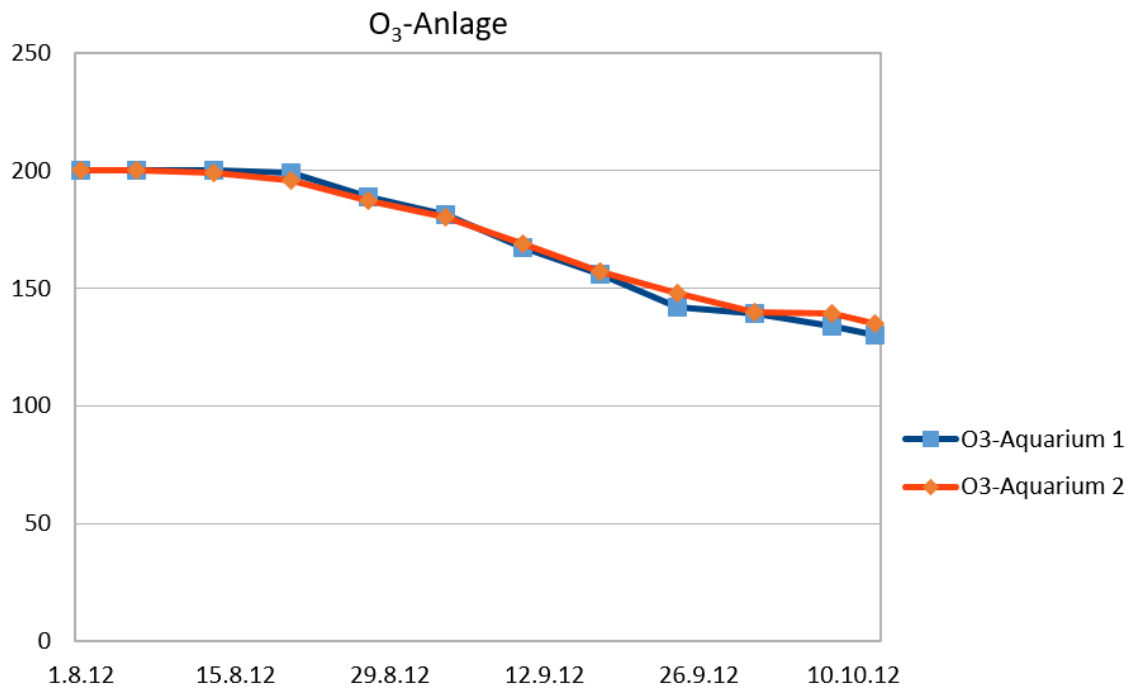


Abbildung A4: Auswertung der Blutegelzahlen in den Aquarien, O<sub>3</sub>-Anlage Pilotversuch.

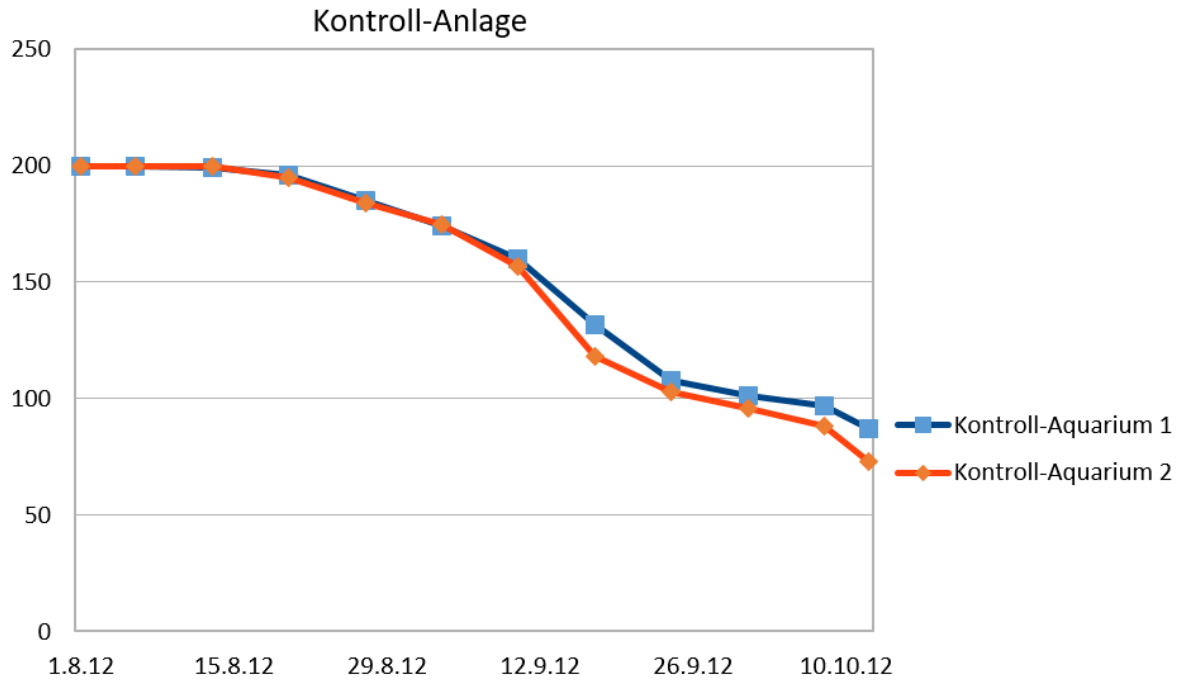


Abbildung A5: Auswertung der Blutegezzahlen in den Aquarien, Kontroll-Anlage Pilotversuch.

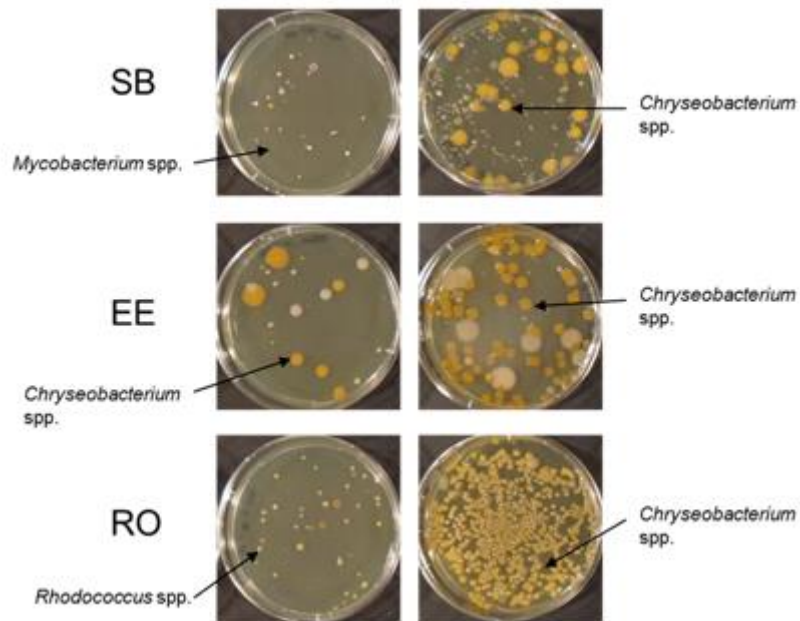


Abbildung A6: Übersicht der identifizierten, auf DEV kultivierten Bakterien der Wasserproben Fütterungsversuch 1 zu den Zeitpunkten t6 (kurz vor Blutfütterung) und t7,5 (kurz nach Blutfütterung). Beispielplatten der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  auf dem Komplexmedium DEV. Wichtigste Gattungen mit typischer Koloniemorphologie sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

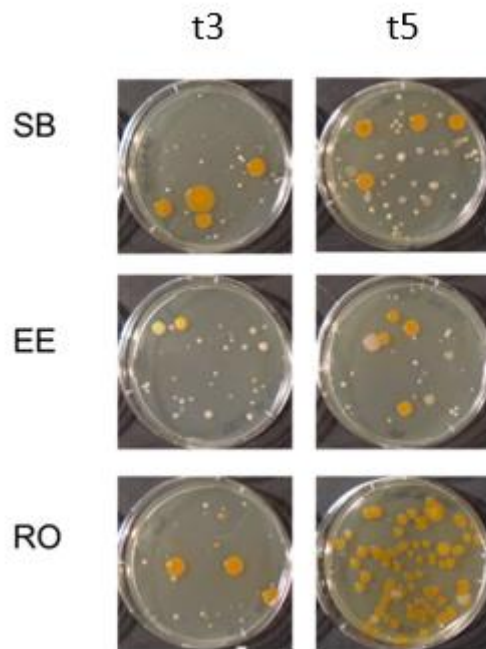


Abbildung A7: Vergleich der abundantesten auf DEV kultivierten Bakterien der Wasserproben aus den drei Anlagen Fütterungsversuch 3, genommen vor (t3) und nach (t5) der Blutfütterung. Beispielplatten der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  auf dem Komplexmedium DEV. tx: Probenahmezeitpunkte, angegeben in Wochen. EE=Eichenextraktanlage, RO=Umkehrosmoseanlage, SB=Schwimmsandfilteranlage.

Tabelle A1: ausgesuchte Wasserparameter, gemessen in vier Teichen mit natürlichen Vorkommen von *H. verbana* in Rumänien (Teiche 1-3: Donaugebiet) und Serbien (Teich 4: Savegebiet)

	Teich 1	Teich 2	Teich 3	Teich 4
KH (°dKH)	11	11	17	13
pH	7,7	7,8	8,6	7,3
GH (°dGH)	9	8	25	9
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	0,025	<0,01	<0,01	<0,01
O <sub>2</sub> (mg/l)	10	4	4	5
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
PO <sub>4</sub> (mg/l)	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
FE (mg/l)	1	1	0,1	0,6

Tabelle A2: Komponenten des Speichelsekrets, (Michalsen & Roth 2012, S. 95), geändert nach Rücksprache m. d. Autor, basierend auf Angaben der Arbeiten von Baskova & Zavalova (2001), Müller (2000, S. 99-117) und Sawyer (1986).

Substanz, nachgewiesen	Wirkung im Wirt
Hirudin	Hemmung der Blutgerinnung durch Bindung an Thrombin
Calin (Saratin)	Hemmung der Blutgerinnung durch Verhinderung der Bindung des Von-Willenbrand- Faktors an Kollagen; Hemmung der kollagenvermittelten Plättchenaggregation
Destabilase	Monomerisierende Aktivität; löst Fibrin auf: thrombolytisch
Hirustasin	Serin-Proteinase; hemmt Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin und neutrophiles Kathepsin G
Bdelline	Antientzündlich; hemmen Trypsin, Plasmin und Acrosin
Hyaluronidase	„Spreading factor“ durch Viskositätserhöhung i. d. Interstitien, Antibiotikum
LDTI (leech- derived tryptase inhibitor)	Thryptaseinhibitor; hemmt die proteolytischen Enzyme der Mastzellen des Wirts
Egline	Antientzündlich, hemmen die Aktivitäten von alpha- Chymotrypsin, Chymase, Subtilisin, Elastase und Kathepsin G
Inhibitor des Faktors Xa	Hemmt die Aktivität des Gerinnungsfaktors Xa durch Bildung eines equimolaren Komplexes
Hemmstoff von Komponenten des Komplementsystems	Ggf. Ersatz beim Fehlen der natürlichen Hemmstoffe
Hemmstoff der Carboxypeptidase A	Erhöht den Bluteinstrom zur Bissstelle
Vermutet werden	
Evtl. histaminähnliche Substanzen	Entzündungsförderung, Gefäßerweiterung, Durchblutungsförderung (Ursache für Hautrötung, Juckreiz)
Acetylcholin	Neurotransmitter
Anästhetikum	Minimiert Störung des Wirts (bisher unidentifiziert)

Tabelle A3: Beispielhafte Auflistung möglicher Indikationen für die Blutegeltherapie

Mögliche Indikationen für Blutegeltherapie (Auflistung lt. Angaben Blutegeltherapeuten)
Arthritis
Rhizarthrose (Sattelgelenksarthrose)
Gonarthrose (Kniegelenksarthrose)
Epikondylitis (z. B. Tennisellenbogen)
Myogelosen (Muskelhärte)
Varikose (Krampfadern)
Venostase (Stockung venöse Blutzirkulation)
Thrombose (Blutgerinnsel in Blutgefäß)
Phlebitis (Entzündung venöses Blutgefäß)
Hämatom (Bluterguss)
Ulcus cruris („offenes Bein“)
Zyste
Tinnitus
Herpes Zoster
Diverse entzündliche Erkrankungen

Tabelle A4: Übersicht über Ammoniumoxidierer, Nitritoxidierer und Denitrifizierer aus den Filtern der Anlagen, Fütterungsversuch 3; CF: Kanisterfilter, SF: Sandfilter.

<b>Ammoniumoxidierer</b>	<b>EE-CF</b>	<b>RO-CF</b>	<b>SB-CF</b>	<b>SB-SF</b>				
Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Nitrosomonadaceae; Nitrosomonas	2,903	0,705	0,211	0,363				
Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Nitrosomonadaceae; Nitrospira	0,007	0,006	0,003	0,030				
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Chromatiales; Chromatiaceae; Nitrosococcus	0,021	0,000	0,000	0,001				
Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Nitrosomonadaceae; uncultured	0,377	0,271	0,211	0,249				
<b>Nitritoxidierer</b>								
Bacteria; Nitrospirae; Nitrospira; Nitrospirales; Nitrospiraceae	4,950	5,410	7,072	0,019				
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Nitrobacter	0,022	0,005	0,001	0,001				
Bacteria; Nitrospirae; Nitrospira; Nitrospirales; 4-29	0,001	0,000	0,001	0,000				
Bacteria; Nitrospirae; Nitrospira; Nitrospirales; 0319-6A21	0,000	0,002	0,001	0,000				
Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfobacterales; Nitrospinaceae; uncultured	0,000	0,003	0,000	0,000				
<b>Denitrifizierer</b>								
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium	2,309	0,639	0,230	0,225				
Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Comamonas	0,068	0,220	0,053	0,076				
Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Hydrogenophilales; Hydrogenophilaceae; Thiobacillus	0,010	0,007	0,051	0,000				
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas	0,038	0,006	0,016	0,010				
Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Dechloromonas	0,130	0,020	0,013	0,001				
Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Achromobacter	0,041	0,000	0,007	0,126				
Bacteria; Actinobacteria; Micrococcales; Micrococcaceae; Micrococcus	0,000	0,002	0,000	0,007				
Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Neisseriales; Neisseriaceae; Vogesella	0,000	0,000	0,000	0,003				
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia	0,000	0,000	0,000	0,004				
Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; uncultured	0,016	0,001	0,000	0,011				
	0	0,01	0,1	0,5	1	2	5	10

## Literaturverzeichnis

- Aldermann, D., & Hastings, D. (1998). Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance- potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science and Technology* 33, S. 139-155.
- Arat, S., Bullerjahn, G., & Laubenbacher, R. (2015). A NetworkBiology Approach to Denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS one* 10(2); e0118235. doi:10.1371
- Bagchi, S., Vlaeminck, S., Sauder, L., Mosquera, M., & Neufeld, J. (12 2014). Temporal and Spatial Stability of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Aquarium Biofilters. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0113515
- Baskova, I., & Zavalova, L. (2001). Proteinase inhibitors from the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Biochemistry* 66, S. 703-714.
- Beuth. (2008). DIN 55350. Berlin: Beuth Verlag.
- Blancheton, J., & et.al. (2013). Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquacultural Engineering* 53, S. 30-39.
- Bundesgesetzblatt. (2013). *Trinkwasserverordnung, Anlage 5*. Von Parameter, für die Verfahrenskennwerte spezifiziert sind: [http://www.gesetze-im-internet.de/trinkqw\\_2001/BJNR095910001.html](http://www.gesetze-im-internet.de/trinkqw_2001/BJNR095910001.html) abgerufen
- Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, B. (18. 06 2009). *Pharmakovigilanz*. (BfArM, Herausgeber) Von <http://www.bfarm.de/DE/Arzneimittel/Pharmakovigilanz/Service/mitteil/mittl-blutegel.html> abgerufen
- Bundestag, D. (2005). *Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln, Arzneimittelgesetz AMG*. Abgerufen am 27. September 2016 von [http://www.gesetze-im-internet.de/amg\\_1976/](http://www.gesetze-im-internet.de/amg_1976/)
- Cesur, Ö. (2009). Randomisierte kontrollierte Studie zur Wirksamkeit der Blutegeltherapie bei symptomatischer Rhizarthrose. *Inaugural Dissertation*. Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen.
- Chmiel, H., Anadere, I., & Moser, K. (1989). Hemorheological changes under blood leeching. *Clinical Hemorheology* 9, 9, S. 569-576.
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., . . . Wagner, M. (Dec. 2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528, S. 504-509.

- Davies, R., & McLoughlin, N. (1996). The effects of feeding regime on the growth and reproduction of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Freshwater Biology* 36, S. 563-568.
- De Schryver, P., & Vadstein, O. (2014). Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *The ISME Journal* 8, S. 2360-2368.
- Eder, H. (2003). *Blut- Strom des Lebens*. Fernwald: bookXpress.
- El-Shafai, S., & et. al. (2004). Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 232, S. 117-127.
- EPA, U. (August 2011). Principles of Design and Operation of Wastewater Treatment Pond Systems for Plant Operators, Engineers, and Managers. *EPA/600/R-11/088*. United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. Von <http://www.epa.gov/nscep/index.html> abgerufen
- Europäische Kommission. (17. 02 2015). *Kennzeichnung und Identifizierung von Equiden*. Von <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/HTML/?uri=CELEX:32015R0262&qid=1432714250357&from=DE> abgerufen
- Fairbrother, J., & et.al. (2005). *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews* 6, S. 17-39.
- Fernandez\_Guerra, A., & et.al. (2012). Habitat-Associated Phylogenetic Community Patterns of Microbial Ammonia Oxidizers. *PLoS ONE* 7(10)(e47330).
- Fitzgerald, C., & et.al. (2015). Ammonia-oxidizing microbial communities in reactors with efficient nitrification at low-dissolved oxygen. *Water Research* 70, S. 38-51.
- Flora, C. o. (12. 08 2015). *CITES*. Von <https://cites.org/>: <https://cites.org/> abgerufen
- Gatesoupe, F. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, S. 147-165.
- Giltner, C., & et.al. (2013). Ciprofloxacin-Resistant *Aeromonas Hydrophila* Cellulitis following Leech Therapy. *Journal of Clinical Microbiology* 51, S. 1324-1326.
- Glaeser, S. P., Galatis, H., Martin, K., & Kämpfer, P. (2013). *Niabella hirudinis* and *Niabella drilacis* sp. nov. isolated from the medicinal leech *Hirudo verbana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, S. 3487-3493.
- Graf, J. (1999). Symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech: a novel model for digestive tract associations. *Infection and Immunity* 1, S. 1-7.

- Graf, J., Whitaker, I., Maltz, M., & Siddall, M. (15. July 2013). Characterization of the Digestive Tract Microbiota of *Hirudo orientalis* and Antibiotic Resistance Profile. (A. S. Surgeons, Hrsg.) *Plastic and Reconstructive Surgery 133 (3)*, 133(3), S. 408e-418e.
- Gundermann, K.-O., Sonntag, H.-G., & Rüden, H. (1991). Denkschrift zur Lage des Fachgebietes Hygiene.
- Gustafson, R., & Bowen, R. (1997). Antibiotic use in animal agriculture. *Applied Microbiology* 83, S. 531-541.
- Hai, N. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology* 119/4, S. 917-935.
- Hall, A. (1999). A comparative analysis of three Biofilter types treating wastewater produced in recirculating aquaculture systems. *Master Thesis*. Blacksburg, Virginia, USA: Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Haubenschild, J. (Jan. 2013). Vergleich verschiedener Wasseraufbereitungsmethoden am Beispiel einer Blutegelzucht. Technische Hochschule Mittelhessen.
- Herter, K. (1968). *Der Medizinische Blutegel und seine Verwandten*. Wittenberg Lutherstadt: A. Ziemsen Verlag.
- Kalyuzhnaya, M., & et.al. (2009). Methylophilaceae link methanol oxidation to denitrification in freshwater lake sediment as suggested by stable isotope probing and pure culture analysis. *Environmental Microbiology Reports* 1(5), 1, S. 385-392.
- Khan, S., & et.al. (2002). Members of the family Comamonadaceae as primary polydegrading denitrifiers in activated sludge as revealed by a polyphasic approach. *Applied and Environmental Microbiology* 68(7), S. 3206-3214.
- Kikuchi, Y., Bomar, L., & Graf, J. (2009). Stratified bacterial community in the bladder of the medicinal leech, *Hirudo verbana*. *Environmental Microbiology* 10, 11, S. 2758-2770.
- Kim, O., Cho, Y., Lee, K., Yoon, S., Kim, M., Na, H., . . . Chun, J. (2012). Introducing EzTxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, S. 716-721.
- Kirby, J., Sader, H., Walsh, T., & Jones, R. (2004). Antimicrobial Susceptibility and Epidemiology of a Worldwide Collection of *Chryseobacterium* ss.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Journal of Clinical Microbiology* 42(1), S. 445-448.

- König, H., Melzer, S., Sudhaus, W., & Wichard, W. (2001). *Kompaktlexikon der Biologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Kuppe, K.-O. (1977). *Der Blutegel in der ärztlichen Praxis*. Stuttgart: Hippokrates Verlag.
- Kutschera, U., & Roth, M. (2005). Cannibalism in a Population of Medicinal Leech. *Biology Bulletin* 6, 32(6), S. 626-628.
- Lane, D. (1991). In E. Stackebrandt, & M. Goodfellow, *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (S. 115-175). Wiley, Chichester, United Kingdom.
- Lange, H. (2012). *Arbeitsvorschriften (Gebrauchsanweisungen)*. Hach Lange GmbH.
- Lanzas, C., & et.al. (2008). The risk and control of Salmonella outbreaks in calf-rising operations: a mathematical modelling approach. *Verterinary Research* 39, S. 13.
- Lotz, R., Fuchs, M., & Moyat, P. (1970). Basic Studies on *Hirudo Medicinalis* for a Space Experiment. *Space Life Sciences* 2, S. 40-44.
- Lunau, M., & et.al. (2005). An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epiflourescens microscopy. *Environmental Microbiology* 7(7), S. 961-968.
- Macherey, N. (2014). *Wasseranalytik, Schnellteste*. Düren: Macherey-Nagel.
- Maltz, M., & Graf, J. (2011). The Type II Secretion System is Essential for Erythrocyte Lysis and Gut Colonization by the Leech Digestive Tract Symbiont *Aeromonas veronii*. *Applied and Environmental Micobiology* 77(2), S. 597-603.
- Marden, J., McClure, E., Beka, L., & Graf, J. (2016). Host Matters: Medicinal Leech Digestive- Tract Symbionts and their Pathogenic Potential. *Frontiers in Microbiology* 7.  
doi:10.3389/fmicb.2016.01569
- Michalsen, A., & Roth, M. (2012). *Blutegeltherapie*. (M. R. Andreas Michalsen, Hrsg.) Stuttgart: Karl F. Haug Verlag.
- Müller, I. W. (2000). *Handbuch der Blutegeltherapie*. Heidelberg: Karl F. Haug Verlag.
- Muyzer, G., De Waal, E., & Uitterlinden, A. G. (Mar. 1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Micobiology* 59(3), S. 695-700.

- Naturschutz, B. f. (1983). *Rote Liste gefährdeter Tiere*. (B. f. Naturschutz, Herausgeber) Abgerufen am 12. 08 2015 von [http://www.bfn.de/0322\\_tiere.html](http://www.bfn.de/0322_tiere.html)
- Naturschutz, B. f. (01. 05 2015). *Wissenschaftliches Informationssystem zum Internationalen Artenschutz*. (B. f. Naturschutz, Herausgeber) Von [wisia.de](http://wisia.de) abgerufen
- Nelson, M., & Graf, J. (2012). Bacterial symbioses of the medicinal leech *Hirudo verbana*. *Landes Bioscience, Gut Microbes* 3-4, 3;4.
- Nelson, M., Bomar, L., & Graf, J. (January/February 2015). Complete Genome Sequence of the Novel Leech Symbiont *Mucinivorans hirudinis* M3T. *Genome Announcements* 3(1), 3(1). Von [genomea.asm.org](http://genomea.asm.org) abgerufen
- Nesemann, H., & Neubert, E. (1999). *Annelida: Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea. Süßwasserfauna von Mitteleuropa* (Bd. 6/2). Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Newman, S. (2007). Antibiotics in Aquaculture: Is responsible use possible? *Global Aquaculture Advocat* 10, S. 36-38.
- Nowak, G. (2002). Pharmacology of recombinant hirudin. *Seminar in Thrombosis and Hemostasis* 28(5), 415-424.
- Ott, B., & et. al. (09. January 2015). Characterization of shed medicinal leech mucus reveals a diverse microbiota. *Frontiers in Microbiology* 5, Article 757.
- Purves, W., Sadava, D., Orians, G., & Heller, H. (2006). *Biologie*. Heidelberg: Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag.
- Sawyer, R. (1986). *Leech Biology and Behaviour* (Bde. 1, 2). Oxford: Clarendon Press.
- Schäfer, S. (2013). *Molekularbiologische Untersuchungen der Zusammensetzung und Abundanz von Bakterien in der Aquakultur einer Blutegelzucht nach unterschiedlicher Wasserbehandlung*. Bachelorarbeit, Justus Liebig Universität, Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement, Giessen.
- Steinbüchel, A., & Oppermann-Sanio, F. B. (2003). *Mikrobiologisches Praktikum*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Storch, V., & Welsch, U. (1997). *Systematische Zoologie* (5. Aufl.). Stuttgart: Gustav Fischer.
- Storch, V., & Welsch, U. (2005). *Kurzes Lehrbuch der Zoologie*. München: Elsevier GmbH.

- Storch, V., & Welsch, U. (2006). *Kükenhal Zoologisches Praktikum*. München: Elsevier GmbH.
- Suzuki, S. (1994). Pathogenicity for avoiding bacterial infections: beat them or join them. *International Journal of Food Microbiology* 21, S. 89-105.
- Taschenberg, E., & Schmidt, O. (1929). *Brehms Tierleben*. Leipzig: Philipp Reclam jun.
- Touchon, M., Barbier, P., Bernadet, J.-F., Loux, V., Vacherie, B., Barbe, V., . . . Duchaud, E. (Nov. 2011). Complete Genome Sequence of the Fish Pathogen *Flavobacterium branchiophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* 77, S. 7656-7662.
- Trontelj, P., & Utevsky, S. (2005). Phylogeny and phylogeography of medicinal leeches (genus *Hirudo*): fast dispersal and shallow genetic structure. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63(2), 63/2, S. 475-485.
- Udert, K., Fux, C., Münster, M., Larsen, T., Siegrist, H., & Gujer, W. (2003). Nitrification and autotrophic denitrification of source-separated urine. *Water Science and Technology* 48(1), S. 119-130.
- Utevsky, S. (2012). Überlebensrate der Hirudoarten. Charkiv, Ukraine.
- van Alphen, N., & et.al. (March 2014). Ciprofloxacin-Resistant *Aeomonas* Infection following Leech Therapy for Digit Replantation: Report of 2 Cases. *The Journal of Hand Surgery* 39, S. 499-502.
- Wasser- Wissen*. (05. September 2016). Von <http://www.wasser-wissen.de/abwasserlexikon/n/nitrifikation.htm> abgerufen
- Westheide, W. (1996). *Spezielle Zoologie*. (W. Westheide, & R. Rieger, Hrsg.) Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Wikipedia. (01. Jan. 2016). *Hygiene*. Von <https://de.wikipedia.org/wiki/Hygiene> abgerufen
- Wildgoose, W. (2001). *Manual of Ornamental Fish*. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Wilkin, P., & Scofield, A. (1991). Growth of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*, under natural and laboratory conditions. *Freshwater Biology* 25, S. 547-553.
- Zamora, L., Vela, A., Palacios, A., Dominguez, L., & Fernandez-Garayzabal, J. F. (2012). *First isolation and characterization of Chryseobacterium shingense from rainbow trout*. Von BMC Veterinary Research 8: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/77> abgerufen

---

Zulhisyam, A., & et.al. (2011). Optimazation of Growth Conditions of Hirudinea sp. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(3), S. 268-275. Von <http://www.ajbasweb.com/ajbas/2011/268-275.pdf> abgerufen

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre: ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Biebertal, 02.03.2017

Harald Thrassivoulos Galatis

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'H. Th. Galatis', written in a cursive style.