

Universität Rostock



Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät

Beiträge zum

## **Doktorandenkolloquium**

am 17. und 18. Februar 2004



Einleitung und Moderation:

Frau Prof. Inge Broer, Promotionsbeauftragte der AUF

Vortragende

Maja Hühns  
Carla Struzyna  
Stephanie Walter

Michael Bastian\*  
Iva Koleva\*  
Yi-Chang Chiang\*

Matthias Franke\*  
Peter Degener\*  
Zita Toth  
Stefan Cantré

Sandra Hoedtke  
Anja Bickel\*

Katrin Komolka  
Anja Hartmann  
Katrin Siebert  
Diana Riebold

Ellen-Rose Trübger\*  
Enrico Frahm\*  
Bärbel Tiemeyer  
Jürgen Kauke\*

Darius Kažemėkas  
Andreas Schmidt\*

\*keine schriftlichen Beiträge eingesandt

# Nachwachsende Rohstoffe in transgenen Pflanzen: Cyanophycin als Ausgangssubstanz für das biologisch abbaubare Polyaspartat

## Renewable resource from transgenic plants: Cyanophycin the resource for a biodegradable polymer

MAJA HÜHNS, Agrobiotechnologie

**ABSTRACT:** The natural resources of the soil should be used through the production of a biological degradable plastic in plants. It is a matter of the polymer cyanophycin, which is isolated from cyanobacteria. This substance could be used as a substitute for the non-biological degradable polymer polyacrylate in dispersing agents or as addition to cleaning agents.

### EINLEITUNG

In diesem Projekt werden transgene Kartoffelknollen zur Produktion eines biologisch abbaubaren Polymers eingesetzt. Die Produktion biologisch abbaubarer Polymere in transgenen Pflanzen ermöglicht es, die natürlichen Ressourcen des Bodens zu nutzen. Daher sollte sich diese Strategie in Zukunft als kostengünstiger im Vergleich zur Produktion über Bakterien und Zellkulturen in Fermentern erweisen. Neben dem thermoplastischen Polymer Polyhydroxybutyrat, das Polypropylen-Eigenschaften hat und in transgenen Pflanzen bereits produziert wird, ist auch die Herstellung von anderen Biopolymeren in der Pflanze von großem Interesse. Unter anderem können solche Polymere als Ersatzstoff für nicht-biologisch abbaubare Polyacrylate in Detergentien oder in der Ölproduktion eingesetzt werden. Kartoffelknollen, die bereits zur Produktion von Stärke in großem Umfang genutzt werden, scheinen für die Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren als Beiprodukt besonders geeignet zu sein, da sie eine kostengünstige Herstellung erlauben sollten. Durch eine Steigerung der Biosynthese ohne eine wesentliche Beeinträchtigung der Fitness der Pflanze erhoffen wir uns einen Weg zur umweltschonenden Produktion eines 100% biologisch abbaubaren Polymers, das eine weite Anwendung in der Wirtschaft findet.

Polyaspartat stellt ein solches biologisch abbaubares Biopolymer dar, das als Ersatz für Polyacrylate genutzt werden kann. Es kann durch Hydrolyse aus Cyanophycin, einem Stickstoffspeicherprotein der Cyanobakterien, das aus einer Polyaspartatkette mit Argininresten besteht, gewonnen werden. Cyanophycin wird über eine Cyanophycin-Synthetase aus den beiden Aminosäuren Arginin und Aspartat gebildet.

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bisher wurden drei verschiedene Cyanophycin-Synthetasegene aus unterschiedlichen Bakterien mit einem konstitutiv exprimierten Promotor fusioniert und in Tabak- und Kartoffelzellen eingebracht. Zwei dieser Cyanophycin-Synthetasegene erwiesen sich als nicht geeignet, entweder weil die Regenerationsraten drastisch reduziert waren oder weil die Expression des Gens in den Pflanzen nicht nachgewiesen werden konnte. Dagegen konnte mit dem dritten verwendeten Synthetasegen in den Pflanzen lösliches Cyanophycin produziert werden. Die Pflanzen zeigen eine veränderte Blattmorphologie. Neben einer verdickten Zellwand und fleckigen Aufhellungen war eine Wachstumsreduktion und eine frühzeitige

Blühinduktion zu beobachten. Diese Veränderungen deuten auf einen massiven Stress in den Pflanzen hin, der möglicherweise durch einen Mangel an frei verfügbarem Arginin und Aspartat verursacht wird. Eine Lösungsmöglichkeit stellt eine Steigerung der Aminosäuresynthese durch die Expression bakterieller Gene aus dem Aminosäurestoffwechsel dar. In Voruntersuchungen konnten drei verschiedene Aminosäuresynthesegene identifiziert werden, die für eine Expression in der Pflanze geeignet sind und nun über Kreuzung in die Cyanophycin-produzierenden Pflanzen eingebracht werden sollen.

### AUSBLICK

Da die Pflanzen durch die Produktion des Polymers Cyanophycin, in ihrem Wachstum beeinträchtigt sind, gibt es verschiedene Lösungsmöglichkeiten. Zum einen können diese Pflanzen mit Pflanzen gekreuzt werden, die verschiedene Aminosäuresynthesegene enthalten. Es sollten Pflanzen entstehen, die das Polymer bilden ohne Mangelercheinungen, die durch die Produktion verursacht werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Produktion von Cyanophycin in den Kartoffelknollen dar, die als Sink-Organ weniger von der Cyanophycinsynthese beeinträchtigt werden sollten. Ein weiterer Vorteil ist, dass im Zuge der Stärkegewinnung Cyanophycin als Nebenprodukt anfallen kann. Auch die Produktion von Cyanophycin in den Plastiden, die ja von Cyanobakterien abstammen, könnte nach bisherigen Daten die Streßsymptome in der Pflanze mildern.

### ZUSAMMENFASSUNG

In den bisherigen Arbeiten wurden drei verschiedene Cyanophycin-Synthetasegene aus Cyanobakterien konstitutiv in Tabak und Kartoffel eingebracht. Dabei zeigte sich dass die Produktion des Polymers nur mit einem dieser Gene möglich war. Diese Pflanzen zeigten zusätzlich einen veränderten Phänotyp, der durch einen Mangel an den essentiellen Aminosäuren Aspartat und Arginin verursacht wird.

# Inducible Cell Death in Transgenic Plants: A System to Obtain Markerfree Transgenic Plants

Carla Struzyna<sup>1</sup>, Katrin Neumann<sup>1</sup>, Karin Sonntag<sup>2</sup> and Inge Broer<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Universität Rostock, Justus v. Liebigweg 8; D-18059 Rostock

<sup>2</sup>BAZ Groß Lüsewitz

A release of transgenic plants in Europe will be possible only when they are free of unnecessary sequences such as antibiotic resistance genes. However, transforming plants without the use of an a selective marker gene is very difficult. A lot of methods to enable the integration of marker- and target genes on different chromosomes and thereby a segregation in the following generation are tested right now. Nevertheless, a large part of the offspring will contain the marker genes, requiring a time-consuming the analysis of many plants. A far easier solution is the use of a system for negative selection.

Die Eliminierung von Markergenen, die zur Transformation von Pflanzen benötigt werden, ist vor allem nach der Novellierung der EU Richtlinie 90/220 ein wesentliches Anliegen der Gentechniküberwachungsbehörden. Die Beschränkung der Fremd-DNA Sequenzen in transgenen Pflanzen ist aber auch aus wissenschaftlichen und praktischen Gründen von Bedeutung: überflüssige und häufig repetitive Sequenzen stellen eine unnötige Quelle für ungewollte Interaktionen (z.B. Gene silencing) dar und die Eliminierung der Markergene ermöglicht sekundäre Transformationen der Pflanzen. Verschiedene Systeme, die eine Trennung von Markergenen und Zielgenen im Genom der Pflanze erreichen wollen, werden zur Zeit untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es, diese Systeme durch die Kopplung eines induzierbaren negativen Selektionsmarkers mit dem als Selektionsmarker für die Transformation eingesetzten Gen zu ergänzen und damit markerfreie Nachkommen der transgenen Pflanzen schnell und effektiv zu selektionieren.

Die Basis für ein negatives Selektionssystem war die Stabilität des inaktivierten Herbizids Phosphinothricin (*N*-Acetyl-Phosphinothricin, *N*-Ac-pt) in den transgenen Pflanzen. *N*-Acetyl-Phosphinothricin dient in diesem System als nicht phytotoxische Induktorsubstanz, die durch die gewebespezifische Expression eines modifizierenden Transgenprodukts in das Phytotoxin Phosphinothricin umgewandelt wird. Als *N*-Ac-Pt deacetylierendes Enzym konnte *in vitro* und *in vivo* die vom *E.coli* *argE*-Gen produzierte *N*-Acetyl-Ornithin-Deacetylase identifiziert werden. Pflanzen, die diese Deacetylase konstitutiv exprimieren, werden durch die Inkubation mit *N*-Ac-Pt abgetötet. Eine Beeinträchtigung im Wachstum und der Regenerations- und Reproduktionsfähigkeit der transgenen Pflanzen durch die Expression des *argE* Gens ist nicht feststellbar.

Das einfachste System um Marker und Zielgen in der Pflanze zu trennen ist der Versuch, eine getrennte Integration der Genen in den Pflanze zu erreichen. Optimal ist die Integration einer einzelnen Kopie der Gene in jeweils unterschiedlichen Chromosomen. Solche Pflanze ermöglichen eine Segregation der Transgenen in der Folgegeneration. Unter optimalen Bedingungen sollten hier markerfreie Pflanzen zu einem Anteil von etwa 25% enthalten sein. Diese optimalen Bedingungen sind im Normalfall nicht gegeben. Durch eine enge Kopplung des Markergens mit der oben genannten Deacetylasegen, das hier als negativer Selektionsmarker dienen soll, wird angestrebt, die markertragenden F1-Pflanzen durch eine Behandlung mit *N*-Ac-Pt selektiv zu eliminieren. Um den Anteil an zielgenetragenden Pflanzen in der Nachkommengeneration zu steigern ist es notwendig,

dass die transgenen Pflanzen zu einem hohen Anteil die Markergene und das Zielgen tragen. Dieser Cotransfer von negativem (Deacetylasegen) und positiven (Antibiotikaresistenzgen) Selektionsmarker sowie dem Zielgen konnte in einzelnen Ansätzen bei Tabak und Raps auf bis zu 69%

gesteigert werden. Um sicherzustellen, dass die Markergene sowie das Zielgen im pflanzlichen Genom in jeweils nur einer Kopie vorliegen und somit in der Folgegeneration Pflanzen, die nur das Zielgen enthalten, liefern können, wird die Kopienzahl mit quantitativer PCR überprüft. Nachfahren von Pflanzen mit einer Kopie sollen mit der Induktorsubstanz *N*-Ac-Phosphinothricin behandelt werden.

Diese wurde bereits im System der induzierten männlichen Sterilität (AG Broer) eingesetzt. Chemisch synthetisiertes *N*-Ac-Pt zeigt aber auch bei Anwendung auf nicht transgene Pflanzen eine phytotoxische Wirkung, die auf eine Verunreinigung zurückzuführen ist. Da hochreines und auch in hohen Konzentrationen phytotoxisch inaktives *N*-Ac-pt biotechnologisch von der Hoechst AG bereits hergestellt werden konnte, schien die biotechnologische Produktion in transgenen Pflanzen, die eine Phosphinothricin-*N*-acetyltransferase exprimieren, ein vielversprechender Lösungsansatz zu sein. In ersten Experimenten mit transgenem Tabak erwies sich das auch als zutreffend; die phytotoxische Wirkung war auf die transgenen Zellen beschränkt. Leider treten aber auch in diesem Verfahren in einzelnen Chargen phytotoxische Verunreinigungen auf. Diese sollen durch verbesserte Aufreinigungsverfahren eliminiert werden. Außerdem ist vorstellbar, dass durch ein Angleichen der bakteriellen DNA-Sequenz an pflanzliche Sequenzen die Deacetylaseexpression und somit die Reaktion verbessert werden kann.

# Influence of environmental stressors and mobile signals on the expression of transgenes in plants

INGE BROER, STEPHANIE WALTER, SANDRA KERBACH, STEFAN KÖHNE and KATRIN NEUMANN  
University of Rostock, faculty of agrarian and ecological sciences, agrobiotechnology

**ABSTRACT:** The expression of the herbicide resistance gene *pat* from the soil bacterium *Streptomyces viridochromogenes* has been analysed in *Nicotiana tabacum* SRI plants in order to analyse the influence of heat stress on plant gene regulation. The *pat* gene can be regulated and inactivated due to the heat stress (37°C) on two expression levels: the *pat* coding region influences the RNA level and the 3' untranslated regions manipulate the protein level. The heat-mediated inactivation can be transferred on both expression levels through the plants by a yet unidentified mobile signal.

## 1 ALLGEMEINES

The stress response of plants is mostly accompanied by the controlled activation and silencing of endogenous plant genes. The appearance of new proteins and the decrease in gene product and mRNA levels of other genes could be detected in several plant species after wounding, anaerobiosis, plant defense reactions, water stress or heat shock (e.g. van Der Krol et al., 1999; Xiong et al., 1999; reviewed in: Broer, 1996). These activations and inactivations are necessary for the controlled response of the plant to environmental stress factors. They are part of the normal regulation procedure in the plant.

Nevertheless, the situation might differ for trans-genes, that integrate randomly into the plants genome. Most of the transgenic plants analysed to date inherited the integrated genes according to the Mendelian laws (e.g. Otten et al., 1981, Trieu et al., 2000). Nevertheless, the lack of transgene encoded proteins was detected in several descendants still carrying the transgene (reviewed in: Broer, 1996). In several plant species, gene suppression was correlated with methylation of CpG residues in the transgene sequence (e.g. John and Amasino, 1989; Pelissier and Wassenegger, 2000). The influence of environmental factors on transgene expression was primarily observed in 1990, when the first transgenic plants (*Petunia hybrida*) carrying the maize A1 cDNA under control of the CaMV35S RNA promoter were released in Germany. Heat stress together with other factors lead to a stable loss of flower pigmentation, accompanied by the methylation of the viral promoter (Meyer et al., 1992).

Transgene inactivation directly correlated to high temperatures was described for transgenic *nia*, *luc*, and *nptII* genes in tobacco (Palauqui and Vaucheret, 1995; Neumann et al., 1997; Conner et al., 1998; Köhne et al., 1998), for the *ltp2-gus* transgene in rice (Morino et al., 1999), and for the *nptII* transgene in *Arabidopsis* (Meza et al., 2001). Already in 1990, the inactivation of the Phosphino-thricin (Pt) resistance gene in single cell cultures of a transgenic *Medicago sativa* line was observed in more than 90% of the cells after 10 days of cultivation at 37°C (Walter et al., 1992). Pt is a structural analogue of glutamic acid, which competitively inhibits bacterial and plant glutamine synthetases (Bayer et al., 1972; Lea et al., 1984).

Resistance genes have been isolated from producerstrains (Thompson et al., 1987; Strauch et al., 1988) and transferred to a variety of plant species (De Block et al., 1988). Both genes encode similar Phosphinothricin-N-acetyl-transferases that inactivate Pt.

## 2 RESULTS

### 2.1 *heat induced inactivation of the pat gene is correlated with the transgene sequence*

The heat-induced inactivation of transgenes may be of importance when transgenic plants are used in agriculture. Since suspension cultures are artificial systems, the heat-induced loss of transgene expression was analysed in a plant system (Neumann et al., 1996).

Based on the DNA sequence of the *S. viridochromogenes pat* gene, three different chimeric genes were constructed: a) the *pat40* gene that is composed of the long (823 bp) 35S promoter, a modified *pat* coding region with an ATG start codon, synthetic 5' and 3' UTR sequences and the *nos* terminator sequence (Broer, 1989), b) the synthetic *patS* gene composed of a short (534 bp) 35S promoter, a synthetic coding region adapted to the plants codon usage, synthetic 5' and 3' UTR's differing from those present in *pat40* and the 35S terminator sequence (Eckes et al., 1989), and c) the *pat43* gene composed of the long 35S promoter, the *patS* coding region, the *pat40* 5' and 3' UTRs and the *nos* terminator (Köhne et al., 1998). All the three genes coding for the same Phosphinothricin-N-acetyl-transferase were transferred to *N. tabacum* SRI and the resulting plants were exposed to different temperature conditions. The inactivation of transgene-related phenotypical characteristics in response to the heat treatment at 37°C was determined by analysing aseptically grown plants as well as plants in the green house. By means of Pt selection, inactivation of the *pat* genes can be recognized by antibiotic-induced damage of the plants.

The activity of the GC-rich *pat40* gene was reduced in 100% of the lines, accompanied by a loss of enzyme activity, the PAT-protein and *pat40* RNA. After resetting the culture temperature to 25°C, transgene activity was regained. Nevertheless, the expression of the synthetic AT-rich *patS* gene was always stable in tobacco plants.

The inactivation of the *pat40* gene was neither correlated with the transgene copy number nor with the methylation of the promoter region, but dependent on the sequence of the transgene itself. Analysing the *pat43* plants we could demonstrate, that the steady state level of *pat* specific RNA could be stabilized by the presence of the *patS* coding region, while no PAT protein could be detected in heat treated *pat43* plants. Hence, the inactivation took place on RNA as well as on Protein level. While the coding region seems to be responsible for the transgene inactivation on the level of RNA the exchange of the 5' and 3' UTRs of the *patS*-gene by that of the heat inactivated *pat40* gene proved that the regulation on

protein level depends on the sequence of the 3' untranslated region.

## 2.2 The heat-treatment results in a systemic silencing of transgene expression

In order to determine whether the heat-induced transgene inactivation is mediated by a mobile signal we performed single-leaf heat-treatments of *N. tabacum* SRI plants carrying the pat40 gene, the pat43 gene or the patS gene, respectively.

In transgenic pat40-plants the incubation of one fully expanded leaf at 37°C led to a strong reduction of transgene encoded enzyme activity in the heat treated leaf as well as in untreated neighbouring leaves. This reduction of transgene-mediated herbicide resistance decreased with the increasing distance to the heat-treated leaf. Molecular analysis of pat-RNA- and PAT-protein - steady state levels revealed, that the systemic loss of transgene-encoded herbicide resistance was based on an inactivation of pat40-expression on the RNA level, thereby causing a loss of the transgenic PAT protein. In contrast to the topmost leaves of the transgenic plant no pat-specific RNA was detectable in untreated leaves adjacent to the heat-stressed leaf. But the same reaction occurred in pat40-plants even in absence of heat stress conditions due to the stress of the grafting procedure.

Similar to pat40-plants untreated leaves of the pat43-plants neighbouring the heat-treated one displayed a visible sensitivity to the herbicide L-phosphinothricin. This was not the case for leaves in the upper part of the scion. Like the heat treated leaf, the neighbouring untreated leaves of pat40 plants lost their transgene expression during the heat treatment on RNA and protein level, while pat43-plants displayed the inactivation only on protein level. And in contrast to pat40-plants the pat43-plants were not influenced in their transgene expression by the grafting stress.

As demonstrated for the plants completely incubated at 37°C, no heat-mediated reduction of transgene expression could be observed in patS-plants on enzyme activity, protein or RNA level.

Hence transgene inactivation can be delivered from the heat treated leaf to adjacent untreated ones. The pat40-gene and thereby the inactivation on the RNA level responds to different stress factors, while the pat43-inactivation and thereby the inactivation on the protein level depends specific on heat stress.

The inactivating signal acting on the expression level of protein seems to be an unspecific factor of *N. tabacum* as it is induced even in absence of the transgene sequence.

## 3 REFERENCES

- Bayer, E.; Gugel, K.H.; Hägele, K.; Hagenmeier, H.; Jessipow, S.; König, W.A.; Zähler, H. (1972) Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Phosphinothricin und Phosphinothricylalanyl-alanin. *Helvetica Chimica Acta* 55: 224-239
- Broer, I. (1989) Expression des Phosphinothricin-N-Acetyltransferase-Gens aus *Streptomyces viridochromogenes* in *Nicotiana tabacum*. Dissertation, University of Bielefeld, Germany
- Broer, I. (1996) Stress inactivation of foreign genes in transgenic plants. *Field Crops Research* 45: 19-25
- Conner, A.J.; Mlynárová, L.; Stiekema, W.J.; Nap, J.-P. (1998) Meiotic stability of transgene expression is unaffected by flanking matrix-associated regions. *Mol. Breeding* 4: 47-58
- De Block, M.; Bottermann, J.; Vandewiele, M.; Dockx, J.; Thoen, C.; Gossele, V.; Movva, N.R.; Thompson, C.; Van Montagu, M.; Leemans, J. (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6: 2513-2518
- Eckes, P.; Vijtewaal, B.; Donn, G. (1989) Synthetic gene confers resistance to the broad-spectrum herbicide L-Phosphinothricin in plants. *J. Cell Biochem. (Suppl.)* 13D: 334
- John, M.C.; Amasino, R.M. (1989) Extensive changes in DNA methylation patterns accompany activation of a silent T-DNA ipt gene in *Agrobacterium tumefaciens*-transformed plant cells. *Mol. Cell Biol.* 9: 4298-4303
- Köhne, S.; Neumann, K.; Pühler, A.; Broer, I. (1998) The Heat-treatment Induced Reduction of the pat Gene Encoded Herbicide Resistance in *Nicotiana tabacum* is Influenced by the Transgene Sequence. *Plant Physiol.* 153: 631-642
- Lea, P.J.; Joy, K.W.; Ramos, J.L.; Guerrero, M.G. (1984) The action of the 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. *Phytochem.* 23: 1-6
- Meyer, P.; Linn, F.; Heidmann, I.; Meyer, H.; Niedenhof, I.; Saedler, H. (1992) Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 231: 345-352
- Meza, T.J.; Kamfjord, D.; Håkelién, A.-M.; Evans, I.; Godager, L.H.; Mandal, A.; Jakobsen, K.S.; Aalen, R.B. (2001) The frequency of silencing in *Arabidopsis thaliana* varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors. *Transgenic Res.* 10: 53-67
- Morino, K.; Olsen, O.-A.; Shimamoto, K. (1999) Silencing of an aleurone-specific gene in transgenic rice is caused by rearranged transgene. *The Plant Journal* 17(3): 275-285
- Neumann, K.; Dröge-Laser, W.; Köhne, S.; Broer, I. (1996) Heat-induced loss of transgene activity detected and analysed in several transgenic *Nicotiana tabacum* lines. In: Schmidt, E.R.; Hankeln, T. (Ed.) *Transgenic organism and biosafety*. Springer-Verlag Berlin: 231-238
- Neumann, K.; Dröge, Laser, W.; Köhne, S.; Broer, I. (1997) Heat Treatment Results in a Loss of Transgene-Encoded Activities in Several Tobacco Lines. *Plant Physiol.* 115: 939-947
- Otten, L.; de Greve, H.; Hernalsteens, J.P.; Van Montagu, M.; Schieder, O.; Straub, J.; Schell, J. (1981) Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 183: 209-213
- Palauqui, J.C.; Vaucheret, H. (1995) Field trial analysis of nitrate reductase cosuppression: a comparative study of 38 combinations of transgene loci. *Plant Mol. Biol.* 29: 149-159
- Pélissier, T.; Wassenegger, M. (2000) A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA* 6: 55-65
- Strauch, E.; Wohlleben, W.; Pühler, A. (1988) Cloning of a phosphinothricin-N-acetyl transferase from *Streptomyces viridochromogenes* Tü 494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *E. coli*. *Gene* 63: 65-74
- Thompson, C.J.; Rao Mova, N.; Tizard, R.; Cramer, R.; Davies, J.E.; Lauwereys, M.; Botterman, J. (1987) Characterisation of the herbicide resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6: 2519-2523
- Trieu, A.T.; Burleigh, S.H.; Kardailsky, I.V.; Maldonado-Mendoza, I.E.; Versaw, W.K.; Blaylock, L.A.; Shin, H.; Chiou, T.J.; Katagi, H.; Dewbre, G.R.; Weigel, D.; Harrison, M.J. (2000) Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings of flowering plants via *Agrobacterium*. *Plant J.* 22(6): 531-541
- van Der Krol, A.R.; van Poecke, R.M.; Vorst, O.F.; Voogt, C.; van Leeuwen, W.; Borst-Vrensen, T.W.; Takatsuki, H.; van Der Plas, L.H. (1999) Developmental and wound-, cold-, desiccation-, ultraviolet-B-stress-induced modulations in the expression of the petunia zinc finger transcription factor gene ZPT2. *Plant Physiol.* 121(4): 1153-1162
- Walter, C.; Broer, I.; Hillemann, D.; Pühler, A. (1992) High frequency inactivation of the phosphinothricin-N-Acetyltransferase gene in transgenic single cell suspension cultures of *Medicago sativa* induced by heat treatment. *Mol. Gen. Genet.* 235: 189-196
- Xiong, L.; Ishitani, M.; Zhu, J.K. (1999) Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 119(1): 205-212

# Kennzahlen der Entsorgungslogistik

Z. TOTH, Institut für Landschaftsbau und Abfallwirtschaft

## 1 WISSENSCHAFTLICHE ZIELSTELLUNG

Unter Entsorgungslogistik versteht man eine Prozesskette, die aus Erfassung, Sammlung, Transport, Umschlag und Lagern besteht. Da etwa 60-80 % der Abfallbeseitigungskosten aus Sammlung, Umschlag und Transport stammen, Einsparungen auf diesen Gebieten können sich auf die Gesamtkosten bedeutend auswirken. Die Abfallsammelkosten sind:

- Behälterkosten
- Fahrzeugkosten
- Personalkosten
- Gemeinkosten

Die Kostenfaktoren bei Umschlag und Transport sind:

- Umschlagkosten
- Kosten des Ferntransports
- Entladekosten
- Gemeinkosten

Um Kostenanalysen durchführen zu können, werden Kennzahlen gebraucht, die die Prozesse charakterisieren und sie damit vergleichbar machen.

Die Kennzahlen lassen sich in drei Gruppen unterscheiden:

1. Technische Kennzahlen beschreiben die verwendete Technik (z.B. Behälter, Fahrzeuge)
2. Organisatorische Kennzahlen beschreiben organisatorische Faktoren, wie z.B. Zeit, Kapazität, Tourenplanung, Reviere.
3. Wirtschaftliche Kennzahlen beschreiben die wirtschaftlichen Beziehungen der Prozesse der Entsorgungslogistik.

Optimierungsmöglichkeiten der Entsorgungslogistik im Allgemeinen sind folgende:

- Einsatz neuer Fahrzeuge
- Innovative Arbeitszeitmodelle
- Streckung der Abfuhrhythmen
- Verbesserte Fahrzeug- und Personalauslastung
- Einsatz von Satellitenfahrzeugen (Trennung des Serviceteams vom Sammelfahrzeug)
- EDV-gestützte Tourenplanung
- Anpassung der Reviere
- Bezirkliche Abfuhr (auf einem Revier alle Abfallarten an einem Tag)

## 2 STAND DER FORSCHUNG

Neben der Literaturverarbeitung mache ich seit Januar 2003 praktische Erfahrungen bei der Stadtentsorgung Rostock GmbH. Dort kann ich beobachten, wie die Entsorgungslogistik in einem Entsorgungsfachbetrieb geplant, durchgeführt und kontrolliert wird. Meine Untersuchungen beschränken sich auf Hausmüll in einem bestimmten Stadtteil von Rostock, wobei die Ergebnisse, bzw. die Methoden auch für andere Stadtteile verwendbar sind.

Nach der Sammlung verschiedener Daten ist es möglich ein Ist-Stand aufzustellen. Dabei werden die

technische und organisatorische Strukturen, das Betriebsdatenerfassungssystem, die Ablauforganisation und ausgewählte Kennzahlen untersucht.

Ich beschäftige mich mit den Organisatorischen Kennzahlen, und konzentriere ich mich auf die Tourenplanung. Ich habe eine Untersuchung durchgeführt; zwei Wochen lang wurde der Weg eines Fahrzeuges mit Hilfe eines GPS-Geräts verfolgt, um die Wege auf einer digitalisierten Karte zu visualisieren. Auf der Karte sind die Straßen mit Hausnummern zu sehen und der Weg, der vom Fahrzeug befahren wurde. Zu den Adressen sind Informationen der Kunden hinzugefügt. Mit Hilfe dieser Datenbank kann man verschiedene Analysen machen. Nach etliche Analysen konnte man einige Schwachstelle finden. Anhand dieser Stellen wird jetzt ein Versuchsprogramm zusammen mit der Stadtentsorgung Rostock GmbH erarbeitet und durchgeführt. Im Rahmen dieses Programms werden unterschiedliche Versionen untersucht und mit Hilfe von GIS ausgewertet.

## 3 INTERDISZIPLINÄRE VERFLECHTUNGEN

- Institut für Geodäsie und Geoinformatik, Universität Rostock
- Stadtentsorgung Rostock GmbH

# Beiträge zur Bemessung geosynthetischer Schläuche

## A contribution to the design of geosynthetic tubes

STEFAN CANTRE, Institut für Landschaftsbau und Abfallwirtschaft

**KURZFASSUNG:** Geosynthetische Schläuche finden seit einigen Jahren verstärkt Anwendung in unterschiedlichen Ingenieurdisziplinen. Es fehlen jedoch immer noch weitgehend wissenschaftliche Untersuchungen zu den tatsächlich auftretenden Kräften bei unterschiedlichen Belastungen, was für die Bemessung nachteilig ist. Zudem sind hydraulische Fragen, insbesondere die Entwässerung des Füllmaterials, nicht hinreichend untersucht und können deshalb nur durch grobe Schätzungen beantwortet werden. Die hier vorgestellte Forschungsarbeit leistet einen Beitrag zur Bemessung solcher geosynthetischer Schläuche.

**ABSTRACT:** Geosynthetic tubes have been used increasingly in the past few years to match different needs of engineering projects. However, scientific research in the field of these constructions is very rare and a lot of problems concerning the design process are still unsolved. Particularly the dewatering process of the fill material has not been sufficiently studied yet. Therefore only estimations can be made during the design process. The research project presented here contributes to the design process of the mechanical and dewatering problems.

### 1 EINLEITUNG

Geosynthetische Schläuche werden im Küstenschutz (Verstärkung von Dämmen, Deichen und Dünen sowie Bau von Wellenbrechern), zur Entwässerung feinkörniger Schlämme (Baggergut, Industrieschlämme) und als Spülfeldbegrenzungen eingesetzt. Die Motivation zur Beschäftigung mit diesem Thema besteht aus zwei Gründen: Es gibt einen großen Bedarf an Küstenschutzbauwerken weltweit, wobei geosynthetische Schläuche eine innovative, häufig kostengünstige Alternative darstellen können. Die Bemessung der Konstruktionen unter Verwendung geosynthetischer Schläuche erfolgt jedoch noch mit sehr großen Sicherheitsfaktoren (4 bis >5). Zudem steht in Mecklenburg-Vorpommern in den kommenden Jahren die Entschlammung einer Vielzahl von kleinen Seen, Boddengewässern und Dorfteichen an. Zur Aufbereitung des Baggergutes zur Verwertung oder Entsorgung könnte das Verfahren mit geosynthetischen Schläuchen – vor allem für kleinere Projekte mit engen Platzverhältnissen – eine gute Lösung sein.

### 2 PROBLEMSTELLUNG

#### 2.1 Befüllen der Schläuche

Die Schläuche werden hydraulisch mit einem Erdstoff-Wasser-Gemisch befüllt. Dabei entsteht ein Druck im Innern des Schlauches, aufgrund dessen sich dieser aufrichtet, bis er idealerweise einen kreisförmigen Querschnitt aufweist. Bei der Annahme kleiner Dehnungen kann das System aus flexibler Schale und einem Füllmaterial, das als flüssig angenommen wird, mit der elementaren Membrantheorie berechnet werden.

Für den entstehenden elliptischen Querschnitt und die wirkenden Spannungen bestehen Berechnungsansätze, z.B. nach Namias (1985). Dabei wird die Zugkraft im Umfang mit

$$T = \gamma \cdot S^2 \cdot \left[ k \cdot \frac{p}{2} \right]^2 \quad (1)$$

berechnet. Der Querschnitt wird mit den beiden Formeln

$$x(\phi) = \left[ E(\phi, k) - \left(1 - \frac{k^2}{2}\right) \cdot F(\phi, k) \right] \cdot p \quad \text{und} \quad (2)$$

$$y(\phi) = \left[ 1 - \sqrt{1 - k^2} \cdot \sin^2 \phi \right] \cdot p \quad (3)$$

ermittelt. Dabei sind:

T	Spannung im Umfang
y	Wichte des Füllmaterials
S	Umfang des Schlauches
k	Parameter der Elliptischen Integrale (s.u.)
p	Druck am Boden des Schlauches, normiert
x	Koordinate
y	Koordinate
$\phi$	Tangentenwinkel
E	elliptisches Integral erster Ordnung
F	elliptisches Integral zweiter Ordnung

Kleine Dehnungen können jedoch nur bei hochfesten Geokunststoffen, wie z.B. Geweben, angesetzt werden. Für den Fall großer Dehnungen, z.B. bei der Anwendung von Vliesen, sind bisher keine Ansätze veröffentlicht. Möglichkeiten zur Lösung sind die Lösung der nichtlinearen Differentialgleichungen für große Dehnungen, die Anwendung numerischer Methoden (FEM oder FDM) oder die iterative Berechnung aufgrund der linearen Membrantheorie.

Diese Forschungsarbeit untersucht mögliche Lösungswege für diesen Bemessungsfall.

#### 2.2 Entwässerungsphase

Bei der Entwässerung des Füllmaterials bildet sich, bei richtiger Bemessung des Geotextilfilters, ein Filterkuchen an den Kontaktflächen des Geokunststoffes aus, der nach einer kurzen Anfangsphase einen Großteil der Filterleistung übernimmt. Die Zeit, die bis zur Ausbildung des Filterkuchens und damit bis zu dem Zeitpunkt, an dem der Austritt von Feinmaterial aus dem Schlauchkörper stark zurückgeht vergeht, kann noch nicht genau ermittelt werden. Genauso wenig kann die Zeit bis zur gewünschten Entwässerung des Materials bestimmt werden.

Die Veränderung des Schlauchquerschnitts bei der Entwässerung ist durch die Verkleinerung des Querschnitts aufgrund des Wasserverlustes für Geokunststoffe mit kleinen Dehnungen einigermaßen

genau abschätzbar. Ob dieses Abschätzungsverfahren für dehnbare Materialien auch Gültigkeit besitzt, wurde noch nicht untersucht.

Das System aus Geokunststoff und Füllmaterial ist sehr komplex, da sich während der Entwässerung Spannungen und der (Poren-) Wasserdruck abbauen, Clogging – und Blocking – Effekte im Geokunststofffilter auftreten und sich die Fließwege durch die variable Querschnittsform ständig ändern.

Für einige dieser Probleme sollen in der Forschungsarbeit grundsätzliche Untersuchungen angestellt und einfache Modelle aufgestellt werden.

### 2.3 Wiederbefüllen

Bei sehr feinkörnigem Füllmaterial und hohem Wassergehalt kann es sinnvoll sein, um die Kapazität eines Schlauches auszunutzen diesen in Intervallen mehrfach zu befüllen. Da sich die unteren Lagen des Füllmaterials bei der Entwässerung bereits verfestigen, kann beim wiederbefüllen nicht mehr einfach davon ausgegangen werden, dass sich eine Flüssigkeit im Innern befindet. Möglicherweise spielt hier die Reibung eine Rolle und auch die Verformung des verfestigten Materials beim Wiederbefüllen könnte neue, größere Kräfte in den Geokunststoff eintragen. Dieses Problem soll im Rahmen von Laborversuchen mit untersucht werden.

### 2.4 Weitere Probleme

Weitere Probleme sind das Stapeln von Schläuchen, das Schwingen in Längsrichtung beim Befüllen und die Verbindung mehrerer Schläuche. Das Verformungsverhalten aufgrund des Stapelns von geosynthetischen Schläuchen wird ein Gegenstand der Beanspruchungsanalyse sein. Die anderen Probleme sind nicht Gegenstand dieser Arbeit.

## 3 ZIEL DER ARBEIT

Zusammengefasst ist das Ziel der Arbeit, auf Grundlage der oben dargestellten Problemstellungen die Bemessungsansätze für geosynthetische Schläuche zu ergänzen. Diese Ergänzungen sollen im Bereich großer Dehnungen und der Belastung (z.B. durch das Stapeln), der Entwässerungszeit feinkörniger Schlämme, der Auswahl sinnvoller Schlauchgrößen für Entwässerungsprojekte und der Umsetzung der Bemessung in einem einfachen Computerprogramm erfolgen.

## 4 ARBEITS-HYPOTHESEN

- Die Spannungen im Umfang vergrößern sich wenn große Dehnungen in Ansatz gebracht werden
- Form und Spannungen lassen sich bei großen Dehnungen hinreichend genau iterativ bestimmen
- Die Spannungen im Schlauchumfang bleiben auch bei der Annahme steiferen Füllmaterials (wieder befüllen) annähernd konstant
- beim aufeinander Stapeln mehrerer Schläuche verändert sich die Spannungsverteilung, insbesondere im Kontaktbereich der Schläuche
- Aus dem Druckfiltrationsversuch lassen sich Aussagen zu sinnvollen Schlauchgrößen für Entwässerungsprojekte ableiten
- Die Entwässerungszeit lässt sich mit Hilfe dieses Laborversuches abschätzen

## 5 THEORETISCHE LÖSUNGSANSÄTZE

### 5.1 Große Dehnungen:

Für die Annahme großer Dehnungen ist die Programmierung der iterativen Lösung, basierend auf der elementaren Membrantheorie bereits erfolgt. Es lässt sich damit errechnen, dass für große Dehnungen bei gleichem angesetzttem Fülldruck größere Spannungen im Umfang entstehen, der Ansatz mit konstantem Umfang die Ergebnisse also unterschätzt. Ab welcher Größenordnung der Dehnungen der einfache Ansatz nicht mehr angewandt werden sollte, muss noch untersucht werden.

Die nichtlineare Membrantheorie ist sehr komplex und die maßgeblichen Differentialgleichungen insbesondere zur Beschreibung der elliptischen Bahnkurve voraussichtlich nicht geschlossen lösbar. Der Ansatz dazu wurde noch nicht gefunden. Jedoch kann bei ausreichender Übereinstimmung der numerischen Verfahren mit den im Labor zu ermittelnden Versuchsdaten im Rahmen dieser Arbeit gegebenenfalls auf diesen Ansatz verzichtet werden.

### 5.2 Verschiedene Belastungsfälle

Die unterschiedlichen Lastfälle von Schläuchen mit unterschiedlichen Füllmaterialien (Wiederbefüllen und Stapeln) können mit der Finite Elemente Methode modelliert werden. Dazu steht das Programmpaket ABAQUS an der Universität Rostock zur Verfügung. Die Ergebnisse der FE Analyse werden mit Ergebnissen aus Laborversuchen verglichen.

### 5.3 Entwässerung

Die Abhängigkeit der Entwässerung von Druck und Fließweg soll untersucht werden. Dazu soll eine geeignete Formel zur Abschätzung der Entwässerungszeit aus den Ergebnissen eines Druckfiltrationsversuchs erfolgen, deren Leistungsfähigkeit durch Labor- und Feldversuche ermittelt werden soll.

## 6 LABORVERSUCHE

### 6.1 Spannungs- Verformungsanalyse

Für die Laborversuche zur Verformungsanalyse wurde eine handhabbare Probengröße ausgewählt. Demnach sind die Probeschläuche 2 m lang und haben einen Durchmesser von 0,2 m. Zur Aufnahme der Dehnungen entlang des Umfanges (zur späteren Ermittlung der Spannungen aus den Materialeigenschaften) wurde ein photogrammetrisches Messverfahren ausgewählt, das genau genug ist, um auch sehr kleine Dehnungsänderungen erfassen zu können. Die erforderliche Genauigkeit ergibt sich aus den geplanten Abständen der auf die Schläuche aufgebrachten Messmarken von 2 cm und einer Messauflösung von 1 % Dehnung zu 200 µm.

Die Messeinrichtung besteht aus vier handelsüblichen Digitalkameras mit einer Auflösung von 3 MP, einem Messraster an der Wand, das als hochgenau eingemessenes Koordinatensystem dient (s. Abb. 1) und einer Messeinrichtung für Temperatur und Schlauchinnendruck. Die Kameras haben einen durchschnittlichen Messfehler von 15 µm und sind damit ausreichend genau.

Die Bildverarbeitung erfolgt mit dem Programm Australis, einer Software zur Auswertung von Bildern in der Nahbereichsphotogrammetrie. Die Berechnung der

Dehnungen aus diesen Koordinatenpunkten muss mit einer geeigneten Umformung unter Einbeziehung der Bogenlänge entlang des Umganges erfolgen.

Mit dieser Messeinrichtung sollen verschiedene Kombinationen von Schläuchen, Füllmaterial, Anordnung und Belastung untersucht werden.



Abb. 1: Photogrammetrische Messeinrichtung

## 6.2 Entwässerung

Die genaue Berechnung der Entwässerungsleistung aufgrund der Eigenschaften der Geokunststoffe und der Füllmaterialien ist aufgrund der Komplexität der Aufgabe nur sehr schwer vorstellbar. Dies ist nicht Inhalt dieser Arbeit. Vielmehr soll getestet werden, ob man mit einfachen, semidirekten Laborversuchen ungefähre Aussagen über das Entwässerungsvermögen und die -zeit treffen kann.

In Vorversuchen wurde die Anwendung des von J. Fowler (1996) vorgeschlagenen Hängesackversuches (s. Abb. 2) auf seine Eignung als Laborversuch überprüft. Der Versuch wurde daraufhin als sinnvoller Laborversuch ausgeschlossen, da er zu viele unwägbare Randeinflüsse enthält, die keine genauen Aussagen über die Entwässerungsleistung und -zeit treffen lassen.



Abb. 2: Hängesackversuch

Deshalb wurde in einem zweiten Schritt eine Versuchseinrichtung mit zwei Druckfiltrationszellen (s. Abb. 3) aufgebaut, in der definierte Randbedingungen und eindirektionale Fließverhältnisse herrschen. Es soll nun geprüft werden, ob man aus den Ergebnissen einer

größeren Testreihe mit dem Druckfiltrationsversuch ein Abschätzungsverfahren für die Entwässerung geosynthetischer Schläuche ableiten kann.

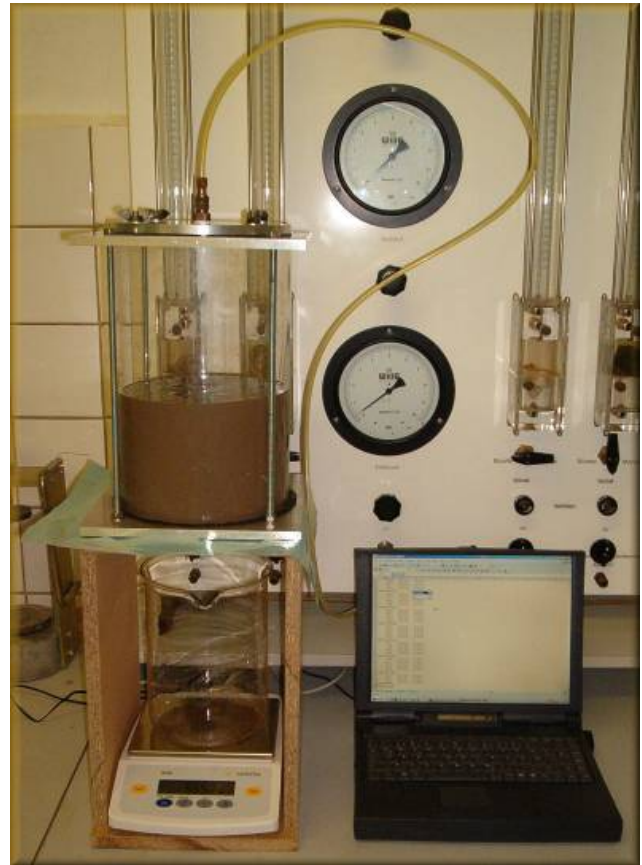


Abb. 3: Druckfiltrationszelle

## 7 AUSBLICK

Es stehen nun folgende wichtige Arbeitsschritte an:

- (1) Der Vergleich der unterschiedlichen Berechnungsmöglichkeiten der Spannungs-Verformungs-Beziehungen,
- (2) die Durchführung der Versuche zur Spannungs-Verformungsanalyse mit
  - undurchlässigem und durchlässigem Schlauchmaterial,
  - mit dehnbarem und nicht dehnbarem Schlauchmaterial,
  - mit gestapelten Schläuchen,
  - mit Wasser und Schlamm als Füllmaterial,
- (3) die Durchführung und Auswertung einer größeren Messreihe im Druckfiltrationsgerät und daraus
- (4) die Ableitung von Abschätzungsformeln für die Entwässerungszeit und eine für die Entwässerung sinnvolle Schlauchgröße.

## QUELLEN

- Namias, V. 1985: Load-Supporting Fluid-Filled Cylindrical Membranes. In: Journal of Applied Mechanics, Vol. 52, Dez. 1985.
- Fowler, J. 1996: Proposed ASTM Method – Standard Test Method for Determining the Flow Rate of Suspended Solids from a Geotextile Containment. Online bei [www.geotecassociates.com](http://www.geotecassociates.com)

# Die Quantifizierung des osmotischen Drucks in Futterpflanzen und seine Veränderung in verschiedenen Stadien der Silagebereitung

## The quantitation of osmotic pressure in forage crops: changes in different stages of silage-making and by the ensiling process

Dipl.-Ing. agr. SANDRA HOEDTKE, Institut für umweltgerechte Tierhaltung, Fachgebiet Tierernährung

**KURZFASSUNG:** Enzymatische Aktivitäten von Pflanzen und Mikroben in der wässrigen Phase von Pflanzen und daraus hergestellten Silagen bewirken einen Anstieg des osmotischen Drucks (Anstieg der Osmolalität, Verringerung der Wasseraktivität). Ein hoher osmotischer Wert wirkt einerseits selektiv auf die vorhandene Mikroflora, andererseits kann er Ausdruck unerwünschter Fermentationsprozesse sein. Für die Herstellung einer Silage von guter Qualität ist daher die Begrenzung der Fermentationsvorgänge auf das für die Silierung notwendige Maß sinnvoll. Aufgrund einer engen Beziehung des osmotischen Drucks mit dem Trockensubstanzgehalt erfolgt eine Schätzung des osmotischen Wertes, die nach Angaben der Literatur zu Fehleinschätzungen führen kann. Mittels eines Gefrierpunktsmometers wird die Osmolalität in Presssäften von Pflanzen und Silagen gemessen. Ziel dieser Arbeit ist die Erweiterung des Kenntnisstandes über Einflussfaktoren auf den osmotischen Druck, um letztlich einen Parameter ableiten zu können, der in die Qualitätsbewertung von Silagen und zu silierendem Material eingehen kann.

**ABSTRACT:** The enzymatical activities of plants and microorganisms in the aqueous fraction of plants and silages cause an increase of osmotic pressure (increase of osmolality, decrease of water activity). On the one hand this increase has a selective effect on the existing microflora, but might on the other hand be the outcome of undesirable fermentation processes. For producing a high quality silage it is reasonable to keep fermentation to a restricted degree that is adequate for ensiling. Because of a strong correlation between osmotic pressure and dry matter content the osmotic value is estimated, what, according to literature, can lead to misinterpretation. The osmolality in plant and silage juices is measured by means of freezing point depression. The purpose of this study is to broaden the state of knowledge of influencing factors affecting osmotic pressure to derive a parameter, that can give information about the quality of silages and plant material that is to be ensiled.

### 1 PROBLEMSTELLUNG

Ein wichtiges Ziel der heutigen Landwirtschaft ist die Herstellung gärbio-logischer guter Silagen sowohl im Interesse der Tiergesundheit und –ernährung als auch im Zuge der Minimierung schädlicher Umwelteinträge und ungewollter Tierausscheidungen durch eine fehlerhafte Silagebereitung.

Neben der Kenntnis des Zucker/Pufferkapazität-Quotienten, des sich daraus ableitenden Mindest-trockensubstanzgehaltes, des Vergärbarkeitskoeffizienten und des trockensubstanzabhängigen kritischen pH-Wertes ist das Einstellen eines hohen osmotischen Drucks in Verbindung mit einem möglichst niedrigen pH-Wert für die Erzeugung anaerob stabiler Silagen von Vorteil.

Während des Silierprozesses kommt es zu einem beträchtlichen Anstieg des osmotischen Drucks. Hierfür können mehrere Faktoren verantwortlich sein, wobei nur einige genannt werden sollen: Vor allem ist das Kollabieren der Zellen zu Beginn des Silierprozesses von Bedeutung. Durch das Platzen der Zellen tritt Zellsaft aus, die darin enthaltenen gelösten Moleküle und Ionen bewirken eine Erhöhung des osmotischen Wertes. Weiterhin treten während des Silierens proteolytische und desmolytische Vorgänge auf. Bei der Proteolyse werden hochmolekulare osmotisch nicht wirksame Proteine zu Oligo-, Dipeptiden und Aminosäuren abgebaut, die osmotisch wirksam sind. In der sich anschließenden Desmolyse bauen Bakterien die Aminosäuren weiter ab. Nicht zuletzt ist die Fermentation während der Silierung als Grund für einen Anstieg des osmotischen Drucks zu nennen. Im Falle einer heterofermentativen Gärung entstehen aus einem Mol Glucose zwei Mol Lactat, es findet somit eine Verdopplung des osmotischen Wertes statt.

Ein Anstieg des osmotischen Drucks ist zunächst als positiv zu werten, da er selektiv auf die Mikroflora wirkt

(LINDGREN, 1991). Allerdings lässt ein sehr hoher osmotischer Druck auf eine Reihe unerwünschter Fermentationsprozesse schließen (Buttersäuregärung, alkoholische Gärung, Proteolyse, heterofermentative Gärung). Eine Begrenzung der Fermentationsprozesse auf das für die Silierung notwendige Maß ist daher anzustreben.

Da im Allgemeinen der osmotische Druck eng mit der Trockensubstanz (TS) korreliert, wird er nicht direkt bestimmt, sondern über den TS-Gehalt geschätzt. Aus der Literatur sind dessen ungeachtet Beispiele bekannt, die über das Auftreten von Buttersäure bei Silagen mit hohen TS-Gehalten berichten (WEIßBACH und HAACKER, 1988; WYSS, 1999; DAVIES und HALL, 1999). Da davon ausgegangen wird, dass bei einem hohen TS-Gehalt ein ebenfalls hoher osmotischer Wert vorliegt, hätte eine Buttersäuregärung durch Gärschädlinge hier sicher verhindert werden müssen. Dies lässt die Frage aufkommen, ob der über den TS-Gehalt ermittelte osmotische Druck zu Fehleinschätzungen führt.

### 2 ZIELE DES PROJEKTES

Aufgrund der geschilderten Problematik ergeben sich die wichtigsten Ziele des Projektes:

- Entwicklung einer Methodik zur sicheren Messung des osmotischen Drucks von Pflanzen und Silagen. Die Messung soll im Presssaft von Silagen und zu silierendem Pflanzenmaterial erfolgen, von welchem angenommen wird, dass er eine repräsentative Probe der wässrigen Phase des jeweiligen Materials darstellt. Die Methode soll sich durch eine geringe Streuung der Messwerte und eine gute Reproduzierbarkeit auszeichnen.
- Ermittlung des Einflusses verschiedener Faktoren auf den osmotischen Druck.

Hier sind vor allem Pflanzenart und -sorte, Vegetationsstadium, Nutzungsjahr und Trockenstoffgehalt (Anwelken) zu nennen.

- Erweiterung des Kenntnisstandes der Auswirkungen des Silierverlaufes auf den osmotischen Druck. Untersuchungen sollen bezüglich siliertechnischer Maßnahmen und des Zusatzes von biologischen Siliemitteln wie Milchsäurebakterienkulturen erfolgen. Von besonderem Interesse ist die Quantifizierung des osmotischen Drucks im Silierverlauf. Systematische Messungen sind bislang in der Literatur nur von GREENHILL (1964) und WEIßBACH (1968) gefunden worden.
- Untersuchung der Fermentationsvorgänge und Bestimmung der Gärprodukte von Silagen.

Es wird erwartet, dass es bei Auswertung der verschiedenen Fragestellungen möglich sein wird, den osmotischen Druck als Qualitätsparameter zur Beurteilung sowohl der Silagequalität als auch des zu silierenden Pflanzenmaterials heranzuziehen.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Aufbereitung des Pflanzenmaterials

Das geerntete Pflanzenmaterial bzw. die aus dem Silostock entnommene Silage wird vor einer weiteren Behandlung zunächst bei -20°C gelagert. Um einen hohen Homogenisierungsgrad zu erlangen, wird das Pflanzenmaterial im gefrorenen Zustand mit einem Fleischwolf gemust (entfällt bei Silagen, da bei gehäckseltem Gut eine Homogenisierung gut möglich ist) und durchmischt.

Die Presssaftgewinnung erfolgt mittels einer Tinkturenpresse bei standardisiertem Druck (120 kp/cm<sup>2</sup>). Vor der Analyse wird der Presssaft nochmals eingefroren.

#### 3.2 Aufbereitung des Presssaftes

Zur Bestimmung des osmotischen Drucks im Presssaft von Pflanzen und Silagen wird der aufgetaute Presssaft zuerst im kochenden Wasserbad erhitzt. Dieser Schritt ist vor allem deswegen als wichtig anzusehen, da durch den Kochvorgang Kristallisationskeime, wie z.B. gelöste Gase, entfernt werden und die Messung ungestört ablaufen kann.

Im Anschluss wird der erhitzte Presssaft zentrifugiert (20 min, 4.000 U/min, 15°C). Der Überstand wird abgenommen und vor der Analyse nochmals gut durchmischt.

### 4 ENTWICKLUNG EINER MESSMETHODIK

#### 4.1 Grundlagen

Nach dem Gesetz von *van 't Hoff* ist der osmotische Druck ( $\pi$ ) das Produkt aus der Gaskonstante (R), der Temperatur (T) und der Konzentration an osmotisch wirksamen Teilchen (c):

$$\pi = R T c$$

Aufgrund seiner Dimension und der proportionalen Abhängigkeit dieser Größe von der Temperatur weist bereits WEIßBACH (1968) darauf hin, dass der osmotische Druck für physiologische Untersuchungen eher ungeeignet ist.

Wesentlich temperaturunabhängiger sind dagegen die Wasseraktivität ( $a_w$ ) und die Osmolalität, welche im Folgenden kurz erläutert werden.

Die Wasseraktivität ist gleich dem relativen Dampfdruck, der als Quotient aus dem Wasserdampfdruck

der betrachteten Lösung (p) und dem Dampfdruck des reinen Lösungsmittels ( $p_0$ ) definiert ist:

$$a_w = p / p_0 \quad (2)$$

Nach dem *Raoult'schen* Gesetz entspricht der relative Dampfdruck dem Molenbruch des Lösungsmittels:

$$p / p_0 = n_{LM} / n_A + n_{LM} \quad (3)$$

Die Wasseraktivität kann somit sowohl über den relativen Dampfdruck als auch über den Molenbruch des Lösungsmittels berechnet werden. Sie nimmt Werte zwischen 0 und 1 an, wobei reines Wasser eine  $a_w$  von 1 besitzt. Mit zunehmender Konzentration an gelösten Molekülen und Ionen geht die  $a_w$  gegen 0. Als Ausdruck der Wasserverfügbarkeit wird die  $a_w$  als Maßstab für die Osmotoleranz von Mikroorganismen verwendet.

Die Osmolalität ist als Konzentration an osmotisch wirksamen Teilchen definiert, die in einem kg Lösungsmittel gelöst sind. Sie zählt zu den kolligativen Eigenschaften eines Stoffes, ist damit eine von der Teilchenzahl und nicht von den physikalischen Eigenschaften abhängige Größe. Eine 1-molare Lösung eines nicht dissoziierenden Stoffes besitzt eine Osmolalität von 1 osmol/kg.

In Folge einer Konzentrationserhöhung von Molekülen und Ionen in einem Lösungsmittel ergeben sich eine Dampfdruckerniedrigung, eine Siedepunkterhöhung sowie eine Gefrierpunkterniedrigung gegenüber dem reinen Lösungsmittel. Über die Änderung des Gefrierpunktes kann die Osmolalität nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{osmol/kg} = \Delta T / 1,86 \quad (4)$$

#### 4.2 Osmolalitätsmessung mittels Kryoskop

Mit dem heutigen Stand der Technik kann die Osmolalität sehr einfach unter anderem über Gefrierpunktsometer (Kryoskope) bestimmt werden.

In einem Proberöhrchen wird die zu messende Lösung (50  $\mu$ l) in eine thermostatisch gesteuerte Kühleinrichtung abgesenkt und auf eine Temperatur unterhalb ihres Gefrierpunktes abgekühlt, ohne dass dabei die Probe kristallisiert. Erst bei Erreichen dieser Auslösetemperatur wird die Eisbildung induziert, indem in der Lösung die Kristallisation durch Vibration ausgelöst wird. Durch frei werdende Kristallisationswärme steigt die Temperatur der Lösung wieder bis zu einem Plateau an, welches durch das Gerät erkannt und automatisch in osmol/kg umgerechnet wird. Die Genauigkeit der Methode soll anhand von Tabelle 1 dargestellt werden.

Tabelle 1. Ermittlung von Fehlereinflüssen verschiedener Faktoren auf die Osmolalitätsmessung

Fehlereinfluss	n	x (msomol/kg)	s%
Parallelen	10	910	1,6
Presssaftaufbereitung	10	905	0,3
(1) Messung	10	905	0,2

In 10 Parallelen wurde eine Modellsilage hergestellt und verschiedene Fehlereinflüsse auf die Osmolalitätsmessung untersucht. Dabei wurde der Einfluss der Parallelenherstellung, der Presssaftaufbereitung (kochen und zentrifugieren) und der Messung an sich überprüft. Bei Betrachtung des Variationskoeffizienten stellt sich heraus, dass der größte zu erwartende Fehlereinfluss in der Herstellung der Parallelen liegt. Bereits die Presssaftaufbereitung weist eine deutlich niedrigere Streuung der

Messwerte auf. Bei wiederholten Messungen derselben Probe sind äußerst geringe Messfehler zu erwarten.

## 5 AUSGEWÄHLTE ERGEBNISSE

### 5.1 Osmolalitätsverlauf während der Silierung

Im folgenden Versuch wurden Modellsilagen eines Klee-Grasgemisches in drei TS-Stufen (frisch und zwei Anwelkstufen) unter Zusatz einer Milchsäurebakterienstarterkultur angefertigt, zu sieben Terminen geöffnet und hinsichtlich ihrer Osmolalität untersucht (Bild 1).

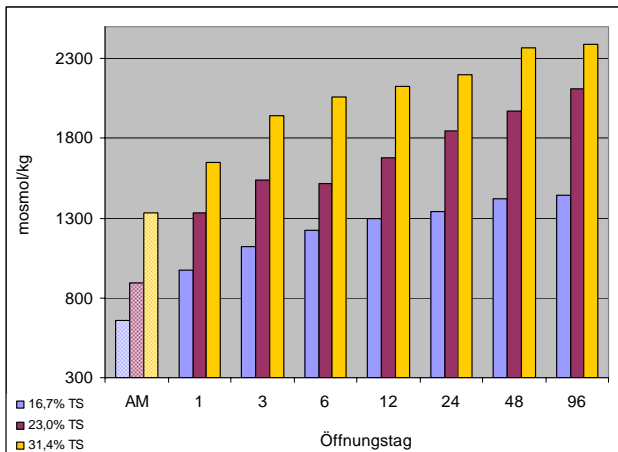


Bild 1. Verlauf der Osmolalität während der Silierung (n=3)

Anhand der Osmolalitäten der Ausgangsmaterialien (AM) lässt sich der Einfluss des Trockensubstanzgehaltes auf den osmotischen Wert erkennen. In den ersten drei Tagen der Silierung ist ein sprunghafter Anstieg der Osmolalität zu verzeichnen. Hierfür überwiegend verantwortlich sind wahrscheinlich katabole Vorgänge, die zum Platzen der Zellen und zur vermehrten Freisetzung von Molekülen und Ionen führen. Weiterhin ist der Osmolalitätsanstieg zwar zeitabhängig degressiv, jedoch kein zum Erliegen kommender Prozess, was bereits durch WEIßBACH (1968) festgestellt wurde. Für einen Anstieg der Osmolalität auch nach Erreichen eines konservierenden Status könnten proteolytische und desmolytische Vorgänge verantwortlich sein.

### 5.2 Test verschiedener Milchsäurebakterienstarterkulturen

In einem Silierversuch wurde anhand der Herstellung von Grassilagen mit unterschiedlichen Zusätzen die Effektivität verschiedener Milchsäurebakterien (MSB) - Präparate getestet. Die Versuchsdauer umfasste 90 Tage, neben einer unbehandelten Kontrolle wurden verschiedene MSB-Präparate verglichen. Eine Unterteilung der Präparate erfolgte dabei nach Applikationsform in flüssig und granuliert anzuwendende MSB (Tabelle 2).

Der Einfluss von MSB auf die Ansäuerung wird im pH-Wert der Silagen bei Versuchsende deutlich. Im Vergleich zur Kontrolle (4,34) konnten die Varianten mit MSB und dabei vor allem die flüssigen Präparate einen weitaus tieferen pH-Wert erreichen. Hinsichtlich der Osmolalität ist bei der Kontrolle ein höherer osmotischer Wert (1768 mosmol/kg) als bei den verschiedenen MSB-Präparaten zu verzeichnen. Im Vergleich zu flüssigen MSB lagen die Osmolalitäten der granulierten MSB eindeutig höher (bis zu 1771 mosmol/kg). Ein Grund dafür könnte in der Applikationsform der MSB liegen. Bei Anwendung flüssiger Präparate kann eine feinere Verteilung der Bakterien im Siliergut vorgenommen werden. Granulierte MSB haben

aufgrund ihrer Anwendungsform eine verzögerte Wirkung, die zur pH-Absenkung erforderliche Milchsäureproduktion findet retardiert statt und ein konservierender Status wird somit erst verspätet erreicht.

Tabelle 2. Vergleich verschiedener Zusätze von Milchsäurebakterien bei Grassilagen (n=3)

Behandlung	pH-Wert	mosmol/kg
<b>Kontrolle</b>	4,34 ± 0,01	1768 ± 52
<b>MSB flüssig</b>		
Präparat 1	3,92 ± 0,01	1449 ± 25
Präparat 2	3,95 ± 0,01	1559 ± 35
Präparat 3	3,93 ± 0,02	1608 ± 68
<b>MSB granuliert</b>		
Präparat 1	3,99 ± 0,01	1649 ± 56
Präparat 2	4,00 ± 0,01	1658 ± 13
Präparat 3	4,12 ± 0,01	1771 ± 21

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Methodik der Osmolalitätsmessung in Presssäften von Pflanzen und Silagen mittels Gefrierpunktosmometer konnte als geeignete Möglichkeit für die Analyse der in diesem Projekt vorgesehenen Fragestellungen herausgestellt werden. Neben dem Vorteil eines geringen Probevolumens zeichnet sie sich weiterhin durch eine gute Reproduzierbarkeit und eine geringe Streuung der Messwerte aus. Weiterer Untersuchungsbedarf besteht zur Problematik der Messung von Proben mit einer sehr hohen Osmolalität, da das Messvermögen des Gerätes nur im Bereich zwischen 0 und 3 osmol/kg liegt.

Die durch enzymatische Prozesse von Pflanzen und Mikroben bedingte Osmolalitätssteigerung im Presssaft von Pflanzen und Silagen wirkt selektiv auf die Mikroflora. Während des Silierprozesses kommt es vor allem in den ersten drei Tagen der Silierung zu einem drastischen Anstieg der Osmolalität, wobei die Erhöhung des osmotischen Wertes nach bisherigen Untersuchungen kein zum Erliegen kommender Prozess ist.

Nach Auswertung aller im Projekt befindlichen Fragestellungen wird erwartet, dass die Osmolalität als Qualitätsparameter in die Bewertung sowohl von Silagen als auch von zu silierendem Material eingehen kann.

### Quellen

- Davies, O.D. und P.A. Hall. The effect of applying an inoculant containing *L. buchneri* to high dry matter ryegrass swards ensiled in wrapped, round bales. *Proceedings of the XII<sup>th</sup> International Silage Conference*. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Sweden: 262-263.
- Greenhill, W.L. 1964. Plant juices in relation to silage fermentation. III. Effect of water activity of juice. *Journal of the British Grassland Society* 19: 336-339.
- Lindgren, S. 1991. Hygienic problems in conserved forage. Forage conservation towards 2000. *Landbauforschung Völkenrode*. Sonderheft 123: 177-190.
- Weißbach, F. 1968. Beziehungen zwischen Ausgangsmaterial und Gärungsverlauf bei der Grünfuttersilierung. Habilitationsschrift. Universität Rostock.
- Weißbach, F. und K. Haacker. 1988. Über die Ursachen der Buttersäuregärung in Silagen aus Getreideganzpflanzen. *Das wirtschaftseigene Futter* 34 (2): 88-89.
- Wyss, U. 1999. Influence of inoculation and pre-wilting of extensively used grass on silage quality. *Proceedings of the XII<sup>th</sup> International Silage Conference*. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Sweden: 125-126.

# Vergleichende Analyse der TSE- assoziierten Genexpression in ausgewählten Geweben von Tieren mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition für die Ausprägung von Scrapie beim Schaf

## Comparative analysis of TSE-associated gene expression in tissues from animals with different genetic predisposition to occurrence of scrapie in sheep

KATRIN KOMOLKA und MANFRED SCHWERIN, Institut für umweltgerechte Tierhaltung, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock und Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere in Dummerstorf

**KURZFASSUNG:** Scrapie beim Schaf gehört zu den Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE). Die Empfindlichkeit an TSE zu erkranken, zeigt beim Schaf eine genetische Prädisposition und wird signifikant durch Genvarianten des Prionproteingenes (PRNG) beeinflusst. Darüber hinaus sind weitere, bisher unbekannte genetische und physiologische Faktoren an der Krankheitsausprägung beteiligt. Mit dem vorliegenden Projekt soll durch vergleichende Expressionsuntersuchungen zwischen Tieren mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition bzw. Gesundheitsstatus (gesund vs. krank) in ausgewählten, am Infektionsweg beteiligten, Geweben einen Beitrag zum besseren Verständnis der Infektionsausprägung beim Schaf geleistet und weitere an der Infektionsabwehr beteiligte Faktoren aufgezeigt werden. Die Genexpressionsstudien werden mittels Chip-Hybridisierung und real-time-PCR in 5 ausgewählten Geweben (Stammhirn, Retropharyngeale LK, Leber, Jejunum, Ileum Peyer) von Schafen der Rasse Texel durchgeführt.

**ABSTRACT:** Transmissible spongiform encephalopathies are a group of diseases which include Scrapie at sheep. The sensitivity to contract with scrapie displays genetic predisposition and is significantly affected by variants of prion protein gene (PRNG). Additional unknown physiological and genetic factors are involved in occurrence of scrapie. Comparative analysis displays changes in the expression in different genotypes and different state of health. In this study of gene expression we are using chip-hybridization and real-time-PCR. 5 different tissues from Texel sheep (brain stem, retropharyngeal lymph nodes, liver, jejunum, ileum peyer) will be analyzed.

## 1 WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND

### 1.1 *Transmissible Spongiforme Enzephalopathie*

Die TSE umfasst eine Gruppe von Erkrankungen, welche artübergreifend in der ganzen Welt verbreitet sind. Es handelt sich hierbei um eine Erkrankung des Gehirns, die durch eine schwammartige Neurodegeneration gekennzeichnet ist. Die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nCJD) beim Menschen und die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind sind in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des öffentlichen Interesses gerückt. Alle TSE-Erkrankungen enden bei Mensch und Tier tödlich (HÖRNLIMANN, 2001).

Es bestehen mehrere Hypothesen über den Erreger dieser Infektionskrankheit. Neben der Virus- und der Virino-Hypothese ist das Prionen-Modell weitgehend anerkannt (RIESNER, 2001).

### 1.2 *Scrapie*

In England wurde 1732 Scrapie (Traberkrankheit) beim Schaf erstmalig beschrieben. Sie gilt als die Urform der TSE-Erkrankungen und ist am weitesten erforscht. Die Infektionskrankheit tritt sporadisch auf. Bereits 1828 wurde erkannt, dass genetische Faktoren bei der Ausprägung der Erkrankung eine Rolle spielen (HÖRNLIMANN, 2001).

Die lange Inkubationszeit von mehreren Monaten bis Jahren führt zu einem Auftreten bei Tieren von 2-5 Jahren. Der Krankheitsverlauf variiert stark zwischen wenigen Wochen bis einigen Monaten (DETWILER L., 2001).

Ebenso vielfältig zeigen sich die Symptome. Die Zerstörung des Zentralen Nervensystems zieht vor allem Verhaltens- und Bewegungsänderungen nach sich. Hierzu gehören die Absonderung von der Herde und ein nervöses oder ängstliches Verhalten. Tremor (willkürliches Muskelzittern), besonders an Kopf und Nacken, Ataxie (Bewegungsablaufstörungen) und Pruritus (Juckreiz) sind häufig beobachtete Symptome, die einzeln oder in

Kombination auftreten. Allgemein nehmen die Tiere trotz Appetit ab und scheuern sich die Wolle im Lenden- und Beinbereich (HEIM, 2002; HOUSTON, 2003).

### 1.3 *Prionen*

Das Prionen-Modell wird auch als „protein-only-hypothesis“ bezeichnet. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die alleinige infektiöse Agens eine krankhafte Form (PrP<sup>Sc</sup>) des körpereigenen Prion-Protein (PrP<sup>C</sup>) ist.

Kommt PrP<sup>Sc</sup> mit PrP<sup>C</sup> in Kontakt findet eine Konformationsänderung von einer schraubigen  $\alpha$ -Helix-Struktur zu einer  $\beta$ -Helix-Faltblattstruktur statt. Die Konformationsänderung führt zu Veränderungen physikalischer und chemischer Eigenschaften. Das PrP<sup>Sc</sup> weist eine hohe Stabilität gegenüber chemischen, enzymatischen und ultravioletten Behandlungen auf (RIESNER, 2001).

Der Pfad der Ausbreitung der PrP<sup>Sc</sup> ist noch nicht vollständig aufgeklärt, findet jedoch am wahrscheinlichsten über die Dendritischen Zellen des Magen-Darm-Traktes, anschließender Wanderung im lymphatischen System und entlang des peripheren Nervensystems zum Stammhirn statt. Die T-Lymphozyten und B-Lymphozyten des Immunsystems scheinen dabei eine entscheidende Funktion zu haben (DETWILER L.A., 2003).

Beim Auftreten von PrP<sup>Sc</sup> und der Ausprägung der Erkrankung spielt die genetische Prädisposition eine wesentliche Rolle. Beim Schaf konnten verschiedene Genotypen, beruhend auf Polymorphismen an den Positionen 136, 154 und 171 im Prionprotein-Gen (PRNG), ausgewiesen werden (siehe Tabelle 1). Diese weisen je nach Rasse eine differenzierte Empfindlichkeit gegenüber einer Erkrankung an Scrapie auf.

Tabelle 1: PrP-Genotypen (Polymorphismus im PRNG an der Position 136, 154 und 171) beim Schaf (modifiziert nach GOLDMANN, 1991)

Resistenz-Klassen	Suffolk, Hampshire Down, Soay, Cotswold	Charolaise, Bleu du Maine	Bluefaced Leicester	Blackface, Cheviot, Dalesbred, Herdwick, Swaledale, Shetland, Welsh Mountain	Texel, Lleyrn
R1	ARR	ARR/ARR	ARR/ARR	ARR/ARR	ARR/ARR
R5		ARQ/VRQ VRQ/VRQ		ARQ/VRQ VRQ/VRQ	ARQ/VRQ ARH/VRQ VRQ/VRQ

Die Resistenzklasse R1 wird als „sehr resistent“ und die Resistenzklasse R5 als „sehr empfindlich“ eingestuft (DETWILER, 2001) Trotz dieser genotypisch gesicherten Einteilung sind in der jüngsten Vergangenheit Scrapie-Fälle bei Tieren mit dem Genotyp ARR/ARR aufgetreten (BMVEL 23.05.2003).

Auch bei der Maus konnte gezeigt werden, dass neben Polymorphismen im PRNG an der Position 108 und 189 (GOLDMANN, 1990) auch QTL's auf den Chromosomen 4, 5, 6, 7, 8 und 17 eine veränderte Anfälligkeit gegenüber TSE-Erkrankungen bewirken (MORENO, 2003).

Dies lässt vermuten, dass weitere, bisher unbekannte physiologische und genetische Faktoren das Auftreten von Scrapie beeinflussen.

## 2 ZIELSTELLUNG UND AUFGABEN

### 2.1 Ziele

Das Ziel dieses Projektes besteht:

1. in der physiologischen Charakterisierung von gesunden Schafen mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition an Scrapie zu erkranken (R1 vs. R5)
2. in der Definition krankheitsassoziierter Expressionsmuster nach gezielter Infektion von Schafen mit differenter Scrapie-Empfindlichkeit.

Diese Untersuchungen werden in ausgewählten, potentiell am Infektionsweg (Darm → Lymphsystem → peripheres Nervensystem → Stammhirn) beteiligten Geweben durchgeführt.

### 2.2 Aufgaben

Aus den vorangestellten Ziele lassen sich folgende Einzelaufgaben ableiten:

1. Untersuchung differenter Expressionsmuster zwischen Tieren unterschiedlicher Resistenzklasse bezüglich der Infektion mit Scrapie in ausgewählten Geweben.
2. Unterscheidung der Expressionsmuster zwischen klinisch gesunden und klinisch erkrankten Tieren nach Infektion mit Scrapie.
3. Quantitative Analyse des Transkriptionsniveaus der funktionellen Kandidatengene.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Versuchsgruppen

Die Untersuchung der unterschiedlichen Resistenzklassen erfolgt bei der Schafrasse Texel. Hierfür wurde eine Herde genotypisiert und eine Auswahl gesunder Tiere für die Gruppe R1 und Gruppe R5 getroffen. In einem weiteren

Experiment wurde eine Differenzierung zwischen Scrapie-infizierten Tieren und gesunden Tieren vorgenommen. Die Aufzucht der infizierten Tiere erfolgt in der Bundesforschungsanstalt für Viruserkrankungen in Tübingen. Jede Versuchsgruppe besteht aus 4 Tieren. Die unterschiedlichen Gruppen werden miteinander verglichen, wobei die Tiergruppe „R1, nicht infiziert, gesund“ jeweils die Referenz bildet. Auf diese Weise können einzelne Einflusskomponenten, welche auf die Tiergruppe wirken, untersucht werden. Der Versuchsaufbau ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Versuchsaufbau vergleichende Chip-Hybridisierung

Chip-Hybridisierung	Test Cy 5	Kontrolle Cy 3
Experiment 1	R 5 Nicht infiziert Gesund	R 1 Nicht infiziert Gesund
Experiment 2	R 1 Infiziert Gesund	R 1 Nicht infiziert Gesund
Experiment 3	R 5 Infiziert Erkrankt	R 1 Nicht infiziert Gesund
Datenvergleich 4	R 5 Nicht infiziert Gesund	R 5 Infiziert Erkrankt
Datenvergleich 5	R 1 Infiziert Gesund	R 5 Infiziert Erkrankt

### 3.2 Methoden

Die qualitative Untersuchung der Expressionsmuster erfolgt über Genexpressionsanalyse mittels heterologer Chip-Hybridisierung. Hierfür wird ovine markierte cDNA mit einem human 10k microarray (MWG, 2002) hybridisiert. Der human 10k microarray enthält 10.000 Spots, die auf einem Objektträger fixiert sind.

Der Versuchsdurchführungsprozess lässt sich in mehrere Schritte einteilen:

- Gewebeentnahme
- RNA-Isolierung
- RNA-Markierung
- Chip-Hybridisierung
- Scannen und Auswertung der Chips

#### 3.2.1 Gewebeentnahme

Die Auswahl der Gewebeproben orientiert sich an dem wahrscheinlich angenommenen Infektionsweg der Scrapie-Erkrankung (siehe oben). Aus 19, unter standardisierten Bedingungen, entnommenen Gewebeproben wurden 5 Gewebearten für weitere Untersuchung ausgewählt. Diese umfassen Ileum Peyer → Jejunum → Leber → Retropharyngealen Lymphknoten → Stammhirn.

#### 3.2.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den unterschiedlichen Geweben erfolgte unter Verwendung von RNeasy® Mini Kit und RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (QUIAGEN GmbH). Hierbei wurden, angepaßt an das jeweilige Gewebe, unterschiedliche Protokolle verwendet. Die isolierten RNA jedes einzelnen Tieres wurde über die Formamid-Gelelektrophorese einer Qualitätskontrolle unterzogen und eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

#### 3.2.3 RNA-Markierung

Die RNA-Markierung erfolgt modifiziert nach dem Protokoll des Herstellers MWG mit den beiden fluoreszierenden Farbstoffen dUTP-Cy3 und dUTP-Cy5 (Amersham Bioscience GmbH). Im ersten Schritt wird zunächst die

Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und diese wiederum einer Zweistrangsynthese unterzogen. Hierfür werden das cDNA Synthesis System Kit (Roche GmbH) und das High Pure RNA Tissue Kit (QUIAGEN GmbH) verwendet. Der Einbau des UTP-gebundenen Farbstoffes erfolgt während des Umschreibungsprozesses von dsDNA in cRNA mit dem MEGAscript T7 Kit (Ambion® GmbH) (MWG genomic diagnosis, 2002).

### 3.2.4 Chip-Hybridisierung

Für die Chip-Hybridisierung werden jeweils 15µg der gelabelten cRNA verwendet. Die Hybridisierung selbst findet in einer Dunkelkammer bei 42°C im feuchten Milieu über Nacht statt. In diesem Versuch werden beide Farbstoffe auf einen Chip aufgebracht. Fehlgebundene sowie überschüssige Sonden werden über 3 Waschschriffe (2x SSC, 0,1% SDS / 1x SSC / 0,5x SSC je 5min bei 32°C) von dem hybridisierten Chip entfernt.

### 3.2.5 Scannen und Auswertung

Das Signal der Farbstoffe wird vom 428 Array Scanner (Affymetrix® Inc.) aufgenommen und in ein Bild umgewandelt. Hierbei entsteht ein Falschfarbenbild. Je nach Wahl des Farbkanals werden die Spots u.a. rot (Cy3) oder grün (Cy5) dargestellt. Haben sich an einen Spot beide, mit unterschiedlichen Farbstoffen markierte, Sonden gleichermaßen stark angeheftet, wird dieser gelb angezeigt (siehe Abbildung 2).

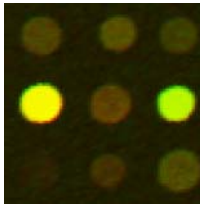


Abbildung 2: Bildauswertung mit ImaGene® (gelb - Cy3 und Cy5 gleich stark exprimiert, rot - Cy3>Cy5 exprimiert; grün - Cy3<Cy5 exprimiert)

Die Software ImaGene® 5 wandelt die Farbwerte der einzelnen Pixel im Bild in Dezimalwerte um. Diese wiederum können mit Hilfe des Programmes GeneSight® 3.5 aufgearbeitet und statistisch bewertet werden. Das unterschiedliche Verhältnis zwischen Cy3 und Cy5 und damit der Tiergruppe, die hinter dem jeweiligen Farbstoff stehen, wird als ratio ausgedrückt.

### 3.2.6 Real-time-PCR

Gene die als signifikant unterschiedlich eingestuft wurden, werden als Kandidatengene quantitativ weiter untersucht. Hierfür verwenden wir die real-time-PCR.

## 4 AKTUELLER STAND UND AUSBLICK

- Die 8 nicht infizierten Tiere der Gruppen R1 und R5 wurden am 09.01.2003 geschlachtet und unter standardisierten Bedingungen jeweils 19 Gewebeprobe n entnommen.
- Die Isolierung der Gesamt-RNA aus allen Geweben ergaben unterschiedliche Ausbeuten.
- Die Methode der Chip-Hybridisierung wurde für die zu bearbeitende Frage modifiziert und etabliert.
- Im Vorversuch wurden Hybridisierungen mit oviner cRNA durchgeführt. Von MWG BIOTECH AG stehen drei 10k-Chips für unsere Zwecke zur Verfügung:
  - human 10k array

- mouse 10k array
- rat 10k array

- Die größte Homologie bei der Hybridisierung mit oviner cRNA zeigte sich nach visueller Auswertung der Chips bei dem human 10k array. Dieses Ergebnis wurde durch einen biometrischen Abgleich mit Gendatenbanken durch MWG BIOTECH AG bestätigt.
- Die Chip-Hybridisierung an den 5 ausgewählten Geweben hat in der 1. Variante des Versuches begonnen. Je Gewebe werden 3 Wiederholungen durchgeführt.
- Ausblick:
  - Der Versuch in Variante 1 wird abgeschlossen
  - Die Auswertung der Daten mittels ImaGene® 5 und GeneSight® 3.5 wird derzeit durchgeführt und die Chip-Hybridisierung weiter fortgesetzt
  - Die Schlachtung der infizierten Tiere, Gewebeentnahme und -aufbereitung erfolgt im Jahr 2004
  - Versuchsdurchführung der Varianten 2 und 3
  - Nach Vorlage der Ergebnisse wird die real-time-PCR durchgeführt

## 5 LITERATUR

- Detwiler, L.; Portrait der Traberkrankheit bei Schaf und Ziege (Scrapie). In: Hörnlimann, B.; Riesner, D.; Kretzschmar, H. (Hrsg.) 2001. Prionen und Prionenerkrankungen. Berlin, New York: Walter de Gruyter.
- Detwiler, L.A.; Baylis, M. 2003. The epidemiology of scrapie. In *Revue scientifique et technique*, 22(1): 121-143
- Glatzel M; Gottwein A; Aguzzi, A., 2002. Prionen als Motor der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien. In: *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 144(12):633-638
- Goldmann, W.; et. al. 1990. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87(7):2476-2480
- Goldmann, W. et. al; 1991. Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene. In: *Journal of General Virology*, 72: 2411-2417
- Heim, D.; 2003 Transmissible spongiforme Enzephalopathie bei Schafen und Ziegen. In: *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 144(12): 675-683
- Hörnlimann, B.; Historische Einführung: Prionen und Prionkrankheit. In: Hörnlimann, B.; Riesner, D.; Kretzschmar, H. (Hrsg.) 2001. Prionen und Prionenerkrankungen. Berlin, New York: Walter de Gruyter.
- Houston, E.F.; Gravenor, M.B.; 2003 Clinical signs in sheep experimentally infected with scrapie and BSE. In: *The Veterinary Record*, 152(11): 333-334
- Moreno, C.R.; Lantier, F.; Lantier, I.; Sarradin, P.; Elsen, J.M. 2003. Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. In: *Genetics*, 165(4):2085-2091
- MWG genomic diagnosis (2002): The complete MWG array application guide for expression profiling experiments (<http://www.mwg-biotech.com/>)
- Riesner, D.; Die verschiedenen Erreger-Hypothesen. In: Hörnlimann, B.; Riesner, D.; Kretzschmar, H. (Hrsg.) 2001. Prionen und Prionenerkrankungen. Berlin, New York: Walter de Gruyter.

# Projekt „Impfmöhre“

## Teilprojekt: Folgenuntersuchungen zur Verabreichung transgener Pflanzen als Futtermittelzusatz beim Nutz- und Labortier

### Research into the consequences of the use of gene engineered plants as fodder additive for laboratory and farm animals

A. HARTMANN und M. SCHWERIN, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock und  
Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere Dummerstorf

**ABSTRACT:** Modern techniques of producing gene engineered plants (e.g. vaccine-producing plants) reveal new possibilities of efficient immunization by means of food or fodder. However nutritional studies have shown that dietary factors (e.g. unbalanced amino acid pattern) can cause metabolism and health problems. The aim of this project was to investigate physiological effects of transgenes (VP60) fed to laboratory rats. Using comparative expression-profiling (chip-hybridization, RT-PCR) VP60 associated changes in the metabolism of spleen, liver and small intestine epithelium shall be recorded and be interpreted in regard to negative side effects. First results indicate changes in the gene expression profile of genes which are involved in immune response, signaltransduction and protein metabolism.

## 1 EINLEITUNG

Moderne Forschungsvorhaben wie z.B. die Erzeugung transgener, impfstoff-produzierender Pflanzen bieten viel versprechende Möglichkeiten der Immunisierung von Mensch und Tier über die Nahrung. In dem vom BMBF geförderten Verbund-Projekt „Impfmöhre“ sollen von den Projektpartnern transgene Pflanzen hergestellt werden, die virale Antigene exprimieren und bei Verfütterung eine Immunisierung im Zielorganismus hervorrufen. Es ist bekannt, dass Nahrungsmittelbestandteile wie z.B. Wasser, Vitamine und Proteine in Abhängigkeit von ihrer Qualität und Quantität den Stoffwechsel des Organismus z.T. beträchtlich beeinflussen (Löffler & Petrides 1997). Da es sich bei viralen Antigenen um normalerweise in der Nahrung nicht vorhandene Proteine handelt, ist eine intensive Folgenforschung zu den Auswirkungen dieser transgenen Futtermittelzusätze auf den Organismus essentiell. Um physiologische Auswirkungen durch Verabreichung dieser transgenen Futtermittel zu untersuchen, werden fütterungsbedingte Genexpressionsprofile in Milz, Leber und Mucosa (Jejunum) von Labor- und Versuchstieren mittels Chip-Hybridisierung und real-time-PCR analysiert. Durch Untersuchung von Veränderungen auf Genexpressionsebene erfolgt eine Charakterisierung der Auswirkungen auf den Stoffwechsel.

## 2 EXPERIMENTELLER ANSATZ

Als Modellsystem für die Herstellung von Impfstoffen in transgenen Pflanzen wird von den Projektpartnern VP60, ein Hüllprotein des Calicivirus der Hämorrhagischen Kaninchenkrankheit (RHDV), in Kartoffelknollen exprimiert (Broer, 2003). RHDV ist eine virusbedingte, mit einer hohen Mortalität (nahezu 90%) einhergehende Tierseuche der Haus- und Wildkaninchen (Ohlinger *et al.* 1989). VP60 wird im Tierversuch an Ratten geprüft. Um die Wirkung dieses künstlich hergestellten Genproduktes ohne den Einfluss von weiteren Faktoren (z.B. Abbaubarkeit der pflanzlichen Zellwand im Verdauungstrakt) zu testen und mit einem bisher genutzten kommerziellen Impfstoff (Cunivac RHD, Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH) zu vergleichen, wurde im ersten Tierversuch in Bakuloviren exprimiertes VP60 intramuskulär appliziert. In einem zweiten Versuch wurde VP60 verfüttert, um die Wirkung bei oraler Applikation zu untersuchen und mit der Wirkung bei intramuskulärer Applikation zu vergleichen. Der experimentelle Ansatz und das Versuchsschema (siehe

Tab.1) der beiden ersten Versuche stellen sich wie folgt dar:

1. Physiologische Effekte von VP60 im Vergleich zu einer Negativkontrolle und einem kommerziellen Impfstoff bei intramuskulärer Applikation.
2. Physiologische Auswirkungen von VP60 bei oraler Applikation im Vergleich zu einer Negativkontrolle.

Tabelle 1. Versuchsschema von Versuch 1 und 2

	Versuch 1	Versuch 2
Applikation	intramuskulär	oral
Versuchsgruppen:		
Kontrolle	leere Zellen	Bakuloviren (Wildtyp)
Testgruppe 1	VP60	VP60
Testgruppe 2	Cunivac RHD	-
Anzahl Tiere/Gruppe	5	6
Untersuchte Organe	Leber, Milz	Leber, Milz, Mucosa
Versuchsdauer	6 Wochen	8 Wochen

Weitere Tierversuche mit oraler Verabreichung von VP60 exprimierenden Kartoffelknollen sind in Planung.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Tiermaterial, Futter und Versuchsbedingungen

Bei den Tierversuchen wurden 5-6 männliche Wistarratten mit einem Anfangsgewicht von 200-400g je Versuchsgruppe verwendet. Als Futter wurde eine halbsynthetische Futtermischung mit lyophilisierten Kartoffeln *ad libitum* eingesetzt. Bei intramuskulärer Applikation wurden VP60, Cunivac RHD und die Kontrolllösung in das rechte, hintere Bein gespritzt. Bei oraler Applikation wurden VP60 und die Bakuloviren (Wildtyp) als Lösung dem Futter beigemischt. Die Tiere wurden einzeln in Stoffwechsellkäfigen gehalten.

### 3.2 Untersuchte Gewebe

Gewebe von Leber (linker lateraler Leberlappen), Milz (1/3 craniale Milz) und Mucosa (Jejunum, Mitte) sollen wegen ihrer spezifischen Funktionen untersucht werden. Die Leber ist z.B. an der Regulation des Kohlenhydrat- und des Fettstoffwechsels, am Auf- und Abbau von Eiweißstoffen beteiligt und hat eine wichtige Speicher- sowie Entgiftungsfunktion. Sie ist bei der Untersuchung von physiologischen Fragestellungen von zentraler Bedeutung. Die Milz wirkt als Blutspeicher und ist durch ihre Funktion als Bildungsstätte der Lymphozyten sowie

der Immunglobuline (Loeffler 1994) für dieses Projekt besonders interessant. Die Mucosa des Darms (Jejunum) ist aufgrund ihrer Funktion bei der Nährstoffresorption von besonderem Interesse.

### 3.3 Genexpressionsanalyse mittels Chip-Hybridisierung

Als Methode zur Untersuchung der Expressionsprofile wird die Chip-Hybridisierung angewendet. Grundlage dieser Methode ist die Hybridisierung von markierter RNA (Fluoreszenzfarbstoff: CyDye, Amersham) mit einem komplementären, an einer definierten Stelle auf einer Trägermatrix (Chip) immobilisierten Oligomer (50mer) eines Gens. Für die Experimente des Projektes werden kommerziell erhältliche Chips Rat 10 K Chips verwendet (MWG Biotech AG).

Aus den Gewebeproben der Versuchstiere der Versuchsgruppen wird die RNA isoliert (RNeasy Kit, Quiagen), eine Konzentrationsbestimmung vorgenommen und eine Qualitätskontrolle mittels Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Abb.1). Die RNA der Kontroll- und der Testgruppen-Tiere wird jeweils gepoolt und in cDNA umgeschrieben (cDNA Synthesis Kit, Roche). Es erfolgt eine direkte Markierung durch den Einbau von fluoreszenz-markierten UTPs (Cy3: rot, Cy5: grün) während der cRNA-Synthese (MEGAscript, Amersham).

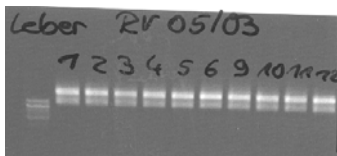


Abbildung 1: Qualitätskontrolle mittels Gelelektrophorese

Die markierte RNA beider Versuchsgruppen wird mit den Oligomeren auf dem Chip hybridisiert und für 24h inkubiert. Dabei lagern sich komplementäre Einzelstränge zusammen. Durch drei Waschschritte (je 5 Min.: 2xSSC + 0,1% SDS; 1xSSC; 0,5xSSC) bei 32 C° wird unspezifisch gebundene RNA entfernt. Die Messung der Signalintensität der spezifisch gebundenen RNA-Moleküle erfolgt durch einen Scanner (Rot: 532nm, Grün: 635nm). Die Ergebnisse der Messung werden als Bilddatei ausgegeben (siehe Abb. 2).

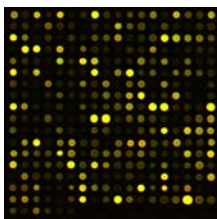


Abbildung 2: Ausschnitt aus der Bilddatei eines Chips

Die Bilddatei wird mit einer speziellen Software bearbeitet (ImaGene, BioDiscovery). Ein Grid (Raster) wird erstellt, um die Spot-Position für den Scanner zu definieren und eine optische Kontrolle aller Spots wird vorgenommen. Die Software GeneSight (BioDiscovery) ermöglicht eine Background-Korrektur sowie den Ausschluss von qualitativ schlechten Signalen. Letztendlich werden die Signalintensitäten in Dezimalwerte umgewandelt. Diese Intensitäten korrelieren mit der Konzentration der RNA in der Probe (=Genexpression) der jeweiligen Versuchsgruppe und können so zum Vergleich genutzt werden. Gene bei denen sich in Kontroll- und Testgruppe unterschiedliche Werte ergeben, werden als „different exprimiert“ bezeichnet. Die Ergebnisse der Chip-Hybridisierung sollen mittels einer quantitativen real-time-

PCR nochmals bestätigt werden. Durch Datenbank-recherchen erfolgt eine Zuordnung möglicher Stoffwechselfunktionen für die unterschiedlich exprimierten Gene.

### 3.4 Real Time PCR

Die Real Time PCR (Polymerase chain reaction) ist eine enzymatische Vermehrung einer Gen-Sequenz (RNA-Molekül) bei der eine kontinuierliche Messung eines Fluoreszenzsignals erfolgt, welches während der PCR proportional mit der Menge des Amplifikationsproduktes ansteigt. Durch den Vergleich der Produktmengen der Probe mit der entstandenen Produktmenge eines Standards mit bekannter RNA-Ausgangskonzentration ist eine Quantifizierung der RNA-Ausgangskonzentration der Probe möglich.

## 4 ERGEBNISSE UND AUSBLICK

- Die Methode zur Chip-Hybridisierung (MWG Biotech) wurde erfolgreich etabliert.
- Die RNA der Gewebe Milz, Leber und Mucosa des 1. und 2. Versuches wurden isoliert. Durchschnittlich wurden 30 mg Gewebe für die Isolierung eingesetzt. Es konnten ausreichende Mengen an RNA für die Hybridisierung erzielt werden.
- Die Chip-Hybridisierungen von Versuch 1 und 2 sowie die Generierung und Bearbeitung der Bilddaten sind weitgehend abgeschlossen. Es wurden Chips bzw. Bilddaten mit guter bis sehr guter Qualität erstellt.
- Die Auswertung der Bilddaten bzw. die Umwandlung der Signalintensitäten in Dezimalwerte sowie die Background Korrektur dieser Werte wurde bereits durchgeführt.
- Eine erste teilweise Beurteilung der generierten Werte weist auf Veränderungen im Expressionsniveau verschiedener Gene z.B. im Bereich der Immunantwort, der Signaltransduktion und des Proteinstoffwechsels hin.
- Eine Statistische Auswertung der Ergebnisse von Versuch 1 und 2 wird derzeit durchgeführt und verschiedene Auswertungsmethoden werden überprüft.
- Die Bestätigung der Ergebnisse mittels real-time-PCR steht aus.
- Ein weiterer Tierversuch mit oraler Verabreichung von VP60 exprimierenden Kartoffelknollen ist in Planung und soll in den nächsten Monaten realisiert werden.

### Quellen

- Broer, I. 2003. Traditio et Innovatio, Forschungsmagazin der Universität Rostock 8 (2): (18-21)
- Loeffler, K. 1994. Anatomie und Physiologie der Haustiere. Stuttgart-Hohenheim. Verlag Eugen Ulmer.
- Löffler, G. & Petrides, P.E. 1997. Biochemie und Pathobiochemie. Berlin-Heidelberg. Verlag Springer
- Ohlinger, V.F.; Haas, B.; Ahl, R.; Weiland, F. 1989. Die infektiöse hämorrhagische Krankheit der Kaninchen – eine durch ein Calicivirus verursachte Tierseuche. Tierärztliche Umschau 44: 284-294.

# Psychosozialer Stress unterschiedlicher Intensität und seine Wirkung auf das Verhalten und physiologische Merkmale bei Afrikanischen Zwergziegen

## Effects of psychosocial stress of different intensity on behaviour and physiology in African dwarf goats

Katrin Siebert, Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) Dummerstorf, Fachbereich Verhaltensphysiologie

**KURZFASSUNG:** Die angestrebte Promotionsarbeit möchte einen Beitrag zur Stressforschung am Nutztier leisten. Insbesondere geht es um die Etablierung eines spezifischen Modells für Stress bei Afrikanischen Zwergziegen, die als Modelltier für Wiederkäuer eingesetzt werden. Weibliche, juvenile Tiere werden an 6 Tagen psychosozialen Stress in Form von 30minütiger Isolation unterworfen. Die komplexe Analyse ethologischer (motorische Aktivität, Vokalisationen) und physiologischer Parameter (Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität) soll die Stressantwort quantifizieren. Durch die getrennte Betrachtung des Aktivierungsgrades beider Zweige des autonomen Nervensystems auf der Basis der Herzfrequenzvariabilität wird speziell die Rolle des bisher wenig berücksichtigten Vagus untersucht.

**ABSTRACT:** The experiments should contribute to research on psychological stress in farm animals. A special model of isolation distress will be established. As a model animal we use African dwarf goats. The effects of 30 minutes of social isolation of different intensity will be studied in juvenile females on six successive days. The complex analysis of both ethological (activity, vocalisations) and physiological parameters (heart rate and heart rate variability) will be used to quantify the stress response. In particular, the role of so far few considered N. Vagus as mediator of the stress response will be examined by separate examination of the activation of both the branches of the autonomous nervous system on the basis of heart rate variability analysis.

### 1 PROBLEMSTELLUNG

Die Frage, wie der Organismus landwirtschaftlicher Nutztiere auf Bedingungen der modernen Haltungs- und Produktionssysteme reagiert, gewinnt mit steigender Forderung nach Tiergerechtigkeit an Bedeutung. Die Bewertung von Haltungsumwelten kann hinsichtlich ihrer Belastung auf den tierischen Organismus nur über eine komplexe Betrachtung ethologischer und physiologischer Kenngrößen objektiv erfolgen. Verhaltensänderungen sind z.B. durch Erfassung und Analyse der allgemeinen motorischen Aktivität quantifizierbar, und aus der bioakustischen Analyse von Lautäußerungen können quantitative und qualitative Parameter gewonnen werden, die Aussagen über Befindlichkeiten zulassen. In Verbindung mit physiologischen Parametern des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren- Systems (HPA) und des sympatho-medullären Systems (SAM) ermöglicht diese komplexe Betrachtungsweise verschiedener Ebenen des Organismus Rückschlüsse auf lang- bzw. kurzfristig wirkende Belastungszustände.

Reaktionen des autonomen Nervensystems lassen sich sehr gut durch Veränderungen der Herzfrequenz interpretieren; so bewirkt z.B. akuter Stress den Anstieg der Herzfrequenz infolge der Erhöhung des Sympathikotonus. Der andere, in der Stressforschung bisher weniger untersuchte Zweig des autonomen Nervensystems, der Parasympathikus (Vagustonus), lässt sich dagegen besser durch Parameter der Herzfrequenzvariabilität (HRV) abbilden. Diese Messgröße findet nach ihrer Etablierung in der Humanmedizin erst vereinzelt in der Nutztierforschung Anwendung.

Zur Evaluierung der Kennwerte der HRV können gezielt Vagus- bzw. Sympathikusblocker eingesetzt werden, mit deren Hilfe die Aktivität des einen oder des anderen Zweiges des autonomen Nervensystems blockiert und die Veränderung der HRV-Parameter mit dem Zustand der Tiere ohne Applikation entsprechender Pharmaka verglichen wird.

### 2 ZIELSTELLUNG UND HYPOTHESEN

#### 2.1 Zielstellung

Mit Hilfe einer definierten Belastungssituation soll die Isolation als spezifisches Modell für Stress bei Ziegen als Grundlage für weiterführende Untersuchungen evaluiert werden und der quantitative Nachweis von psychosozialen Stress mit Methoden der nichtinvasiven Messung und Analyse der HRV gelingen.

#### 2.2 Hypothesen

1. Die soziale Isolation wirkt als Stressor. Unterschiedliche „Qualitäten“ der Isolation werden unterschiedlich stark von den Tieren bewertet.

Die weiblichen Mitglieder einer Ziegenherde bilden enge, stabile Familienverbände, Separation des Einzeltieres von der Gruppe stellt eine Belastungssituation dar. Die Auslenkung der sympatho-vagalen Balance, verursacht durch das Herunterregeln des Vagustonus mit oder ohne Aktivierung des sympathischen Nervensystems, sollte sich in den Parametern der HRV (Parasympathikus) niederschlagen. Parallel dazu wird die Reaktion auf den Belastungszustand durch das gezeigte Verhalten (motorische Aktivität, Aufrichten) und die Anzahl und Art der Vokalisationen, die der Kontaktaufnahme zu den entfernten Gruppenmitgliedern dienen, sichtbar. Die vermehrte physische Anstrengung während der Isolationsphase kann den durch die soziale Isolation verursachten psychischen Stress überlagern/ maskieren. Mit Hilfe eines während der Isolationszeit erstellten Aktivitätsscores zur Quantifizierung der physischen Anstrengung sollte eine Beurteilung, evtl. Korrektur der HRV-Parameter möglich sein.

2. Die Tiere verändern im Laufe der 6tägigen Versuchswoche ihre Stressantwort auf die Isolation. Erwartet wird eine Habituation. Die Tiere werden lernen, dass die Isolation nur vorübergehend, d.h. zeitlich begrenzt, erfolgt und sie danach in ihre vertraute Sozialstruktur und Umgebung zurückkehren.

Es kann auch der gegenteilige Effekt, eine Sensibilisierung auftreten, wobei der Erregungszustand zunimmt, je häufiger der Organismus der Belastungssituation ausgesetzt ist.

3. Die Ergebnisse der HRV-Messungen lassen sich nach Applikation von Vagus- bzw. Sympathikusblockern verifizieren.

Durch Einsatz entsprechender Pharmaka, die gezielt die Blockade je eines Zweiges des autonomen Nervensystems bewirken, sollten Veränderungen der kardiovaskulären Reaktion mittels Analyse der HRV-Werte nachgewiesen werden können.

### 3 DURCHFÜHRUNG

Die Untersuchungen werden an weiblichen, juvenilen, ca. 5 Monate alten Afrikanischen Zwergziegen aus der Zucht des FBN vorgenommen.

Die Versuchstiere werden an 6 Tagen jeweils 30 min sozial isoliert, d.h. Separation des Individuums von den vertrauten Gruppenmitgliedern. Mit jeweils anderen Versuchstieren wird die Isolation in drei unterschiedlichen Qualitäten durchgeführt, wobei in folgender Reihenfolge eine Abnahme der Intensität postuliert wird:

- soziale, akustische, visuelle Isolation („total“),
- soziale, visuelle Isolation,
- soziale Isolation.
- 

Folgende Parameter kommen zur Aufzeichnung: mit dem Gerätesystem Polar S810 (POLAR-Electro GmbH):

- Herzfrequenz (beats per minute) und HRV, mittels Video:
- Motorisches Verhalten und
- Vokalisationen.

Die pharmakologischen Blockadeversuche werden an unbeeinflussten Tieren vorgenommen.

Zum Einsatz kommen Propranolol als unspezifischer  $\beta$ -Blocker zur Blockade des Sympathikus und Atropin als Acetylcholin-Antagonist zur Blockade des Parasympathikus.

### 4 ZUSAMMENFASSUNG

Im angestrebten Promotionsvorhaben werden Afrikanische Zwergziegen, die als Modelltier für Wiederkäuer dienen, sozialer Isolation unterschiedlicher Intensität ausgesetzt. Die in dieser definierten Belastungssituation gezeigten ethologischen und physiologischen Veränderungen werden simultan erfasst. Die Analyse aufeinander folgender Herzschläge aus nichtinvasiver Messung führt zu Parametern der Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität. Diese erlaubt Rückschlüsse auf die sympatho-vagale Balance des Organismus, und insbesondere Aussagen zur Aktivierung des Parasympathikus, des in der Stressforschung am Nutztier bisher kaum beachteten Zweiges des autonomen Nervensystems.

# Pneumocystis sp. – Optimierung der Diagnostik und Erregerreservoir

## Pneumocystis sp. – Enhancement of Diagnostic Procedures and Detection of Reservoirs

D. RIEBOLD, Division of Tropical Medicine and Infectious Diseases, Faculty of Medicine and  
Institute of Environmental Animal Husbandry, Faculty of Agriculture and Environment

**KURZFASSUNG:** *Pneumocystis sp.* ist als Erreger von Lungenentzündungen sowohl beim Menschen als auch bei verschiedenen Säugetier-Spezies bekannt. Es wurde aber auch in Einzelfällen nachgewiesen, daß auch Vögel den Erreger tragen. Die Pneumocystis Pneumonie (PCP) tritt meist bei abwehrgeschwächten Individuen mit schweren Grunderkrankungen auf. Faktoren wie Streß oder schlechte Haltungsbedingungen können bei Nutztieren ebenfalls eine Abwehrschwäche auslösen. Ziele der Untersuchungen sind die Optimierung der Diagnostik und die Untersuchung von abwehrgeschwächten und gesunden Legehennen auf das Vorkommen von *Pneumocystis sp.*

**ABSTRACT:** *Pneumocystis sp.* causes opportunistic pneumonia in immunocompromised human and mammal hosts, but single cases of Pneumocystis Pneumonia (PCP) are also known in birds. The PCP mainly affects individuals with immunosuppressive diseases. Stress factors or housing conditions may trigger an immunosuppression in domestic flock animals. Our goal is to optimise the diagnostic methods and examine immunocompromised and healthy laying hens for the presence of *Pneumocystis sp.*

### 1 EINLEITUNG

(Ausgangsmaterial: 5000 Zysten/mL) mittels mtLSU nested PCR untersucht.

#### 1.1 Der Erreger

*Pneumocystis sp.* verursacht sowohl beim Menschen als auch bei verschiedenen Säugetier-Spezies schwere Pneumonien. Eine *Pneumocystis jiroveci* Pneumonie (PCP) tritt bei Menschen oft in Folge einer HIV-Infektion, immunsupprimierender Therapie oder eines Lymphoms auf (Selik 1995). Bei anderen Säugetierspezies (wie z.B. Hunden, Schweinen und Pferden) konnten keine eine PCP begünstigenden Faktoren nachgewiesen werden (Hagiwara 2001, Icenhour 2001).

Durch die relativ aufwendigen und bisher wenig sensitiven Nachweismethoden erfolgte meist keine routinemäßige Kontrolle von an Lungenentzündung erkrankten oder verendeten Tieren auf PCP.

#### 1.2 Diagnostische Methoden

Ausgangsmaterial für den Nachweis der PCP ist in der Regel broncho-alveoläre Lavage (BAL) (Cruciani 2002). Bei der Untersuchung von Tieren werden meist Lungenschnitte verwendet.

Als Standard-Färbemethode zum Pneumocystis-Nachweis wird die Methamin-Silber-Färbung (Grocott-Färbung) mit einer Sensitivität von 60 bis 80% und einer Spezifität von 80% verwendet (Tiley 1994). Neue PCR-Techniken wie die *Pneumocystis* mitochondrial transcribed large subunit (mtLSU) rRNA Gen nested PCR haben mit 93% bis 95% eine wesentlich höhere Sensitivität und Spezifität (Savoia 1997).

### 2 MATERIAL UND METHODEN

#### 2.1 Optimierung der Diagnostik

BAL von 145 Patienten mit Verdacht auf PCP diente als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen. Die BAL wurde in vier Fraktionen aufgeteilt und parallel mittels Grocott-Färbung, Giemsa-Färbung, direktem Fluoreszenztest (DFT) und mtLSU nested PCR untersucht. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der PCR wurden Verdünnungsreihen von *P. jiroveci*-positiven Proben

#### 2.2 Resistenztestung

Durch die PCP-Prophylaxe mit Co-trimoxazol (Trimethoprim-Sulfamethoxazol) treten bei PCP-Patienten vermehrt gegen Sulfamethoxazol resistente *P. jiroveci*-Stämme auf. Mittels Dihydropteroat Synthase (DHPS) Gen nested PCR und anschließender Sequenzierung können die für die Resistenz-Ausbildung verantwortlichen Punktmutationen nachgewiesen werden. Dazu wurden die DNA-Isolate aus 2.1. mittels DHPS nested PCR amplifiziert und alle positiven Proben sequenziert. Die Auswertung der DNA-Sequenzen erfolgte mittels BLAST ([www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov), Version 2.2.8), pDRAW 32 (Acaclone software, [www.geocities.com/acaclone](http://www.geocities.com/acaclone), Version 1.1.74, Freeware) sowie GeneRunner (Hastings Software, Inc., Version 3.05). Alle Sequenzen wurden anschließend manuell verglichen.

#### 2.3 Untersuchung von Legehennen

Der Nachweis von *P. carinii* Antikörpern bei Hühnern läßt auf eine Exposition der Tiere mit dem Erreger schließen (Settnes 1994). Aus diesem Grund sollte ein direkter Nachweis mittels PCR im Rahmen dieser Untersuchungen angestrebt werden.

Von 40 verendeten Legehennen aus Volierenhaltung wurden bisher 12 Tiere mittels mtLSU nested PCR untersucht. Von jedem Tier wurden separat Lunge und Luftsäcke aufgearbeitet. Eine Gruppe von 40 gesunden Tieren soll später als Vergleichsgruppe dienen.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Optimierung der Diagnostik

*P. jiroveci* konnte bei 4/145 (2,8%) Patienten mit PCP-Verdacht in der Grocott- bzw. Giemsa-Färbung und bei 9/145 Patienten (6,2%) im DFT nachgewiesen werden. Die 1. Stufe der mtLSU nested PCR war bei 15/145 Patienten (10,3%), die 2. Stufe bei weiteren 36 Patienten (24,8%) positiv.

Die Sensitivitätstestung zeigte, daß die Nachweisgrenze der 1. PCR-Stufe bei ca. 200 Zysten/mL Ausgangsmaterial liegt. Führt man beide Stufen der nested PCR nacheinander durch, liegt die Nachweisgrenze bei einer Zyste/mL Ausgangsmaterial.

### 3.2 Resistenztestung

Mittels DHPS nested PCR und anschließender Sequenzierung konnte bei 3 PCP-Patienten eine Punktmutation auf Codon 171 des DHPS Gens nachgewiesen werden. Dabei wurde TCA zu TCG ausgetauscht, die Aminosäure Serin wurde jedoch nicht ausgetauscht (Riebold 2003).

### 3.3 Untersuchung von Legehennen

Bei 12 bisher untersuchten Legehennen konnte weder in den Luftsäcken noch in der Lunge Pneumocystis-DNA nachgewiesen werden.

## 4 ZUSAMMENFASSUNG

Mittels der hoch sensitiven mtLSU nested PCR konnte eine PCP in mehr als 10% der untersuchten Pneumonie-Verdachtsfälle nachgewiesen werden. Diese Methode kann auch geringe Mengen (Nachweisgrenze: 1 Zyste/mL) von Pneumocystis-DNA detektieren und weist spezies-spezifisch *Pneumocystis sp.* nach. Die Routine-Färbemethode, die Grocott-Färbung, war nur bei 2,8% der Patienten positiv.

Durch anschließende Sulfamethoxazol-Resistenztestung der positiven Proben ließ sich mittels DHPS nested PCR und Sequenzierung keine eindeutige Resistenzausbildung nachweisen. Bei drei Patienten wurde jedoch eine Mutation auf Codon 171 des DHPS Gens detektiert, bei der es nicht zu einem Aminosäuren-Austausch kommt. Es ist fraglich, ob es sich bei dieser Mutation um eine Resistenzentwicklung oder um eine spontane Mutation handelt.

Legehennen, die in Volieren gehalten werden, sind durch Ammoniakkonzentration und Staubbelastung in der Luft sowie streßbedingt durch die Haltung in großen Gruppen besonders gefährdet an Infektionen zu erkranken.

Bei den 12 untersuchten Legehennen fand sich bisher keine Pneumocystis-DNA. Dies kann sowohl an der bisher geringen Probenzahl, an der verwendeten Untersuchungsmethode als auch an der hohen Variabilität des mtLSU rRNA Gens zwischen den einzelnen tierspezies-spezifischen *Pneumocystis sp.* liegen. Eine endgültige Auswertung erfolgt nach der Untersuchung aller Gruppen. Ziel der Arbeit ist es, eine PCR zu entwickeln, die in der Lage ist alle bisher bekannten tier- und menschenpathogenen *Pneumocystis*-Spezies nachzuweisen.

## QUELLEN

- Cruciani M, Marcati P, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-analysis of diagnostic procedures for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected patients. *Eur Respir J* 2002; 20: 982-9.
- Hagiwara Y, Fujiwara S, Takai H, Ohno K, Masuda K, Furuta T, Nakayama H, Doi K, Tsujimoto H. *Pneumocystis carinii* Pneumonia in a Cavalier King Charles Spaniel. *J Vet Med Sci* 2001; 63: 349-351.
- Icenhour CR, Rebholz SL, Collins MS, Cushion MT. Widespread occurrence of *Pneumocystis carinii* in commercial rat colonies

- detected using targeted PCR and oral swabs. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3437-41.
- Riebold, D. *Pneumocystis jiroveci* partial DHPS gene for dihydropteroat synthase, isolate 171. *EMBL* 2003. Accession Number AJ586567.
- Savoia D, Millesimo M, Cassetta I, Forno B, Carmello P. Detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification in human immunodeficiency virus-positive patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 29: 61-5.
- Selik RM, Chu SY, Ward JW. Trends in infectious diseases and cancers among persons dying of HIV infection in the United States from 1987 to 1992. *Ann Intern Med* 1995; 123: 933-936.
- Tiley SM, Marriott DJ, Harkness JL. An evaluation of four methods for the detection of *Pneumocystis carinii* in clinical specimens. *Pathology* 1994; 26: 325-8.

# Hydrologische Analyse und Management von Dränflächen zur Reduzierung diffuser Stoffeinträge in Oberflächengewässer

## Hydrological analysis and management of tile-drained fields aiming at the reduction of diffuse pollution of surface water bodies

B. TIEMEYER, Institut für Bodenkunde und Pflanzenernährung

**KURZFASSUNG:** Das Promotionsvorhaben thematisiert die für den Stoffaustrag aus landwirtschaftlichen Flächen bedeutsame Kombination von Dränung und präferenziellem Fluss auf verschiedenen Maßstabsebenen. Dazu werden im Einzugsgebiet der Zarnow (südöstlich von Rostock bei Dummerstorf) Abflüsse und Stoffkonzentrationen im Dränsammler, in Gräben und in der Zarnow gemessen sowie eine bodenkundliche und topographische Aufnahme des Untersuchungsgebietes durchgeführt. Diese Daten finden Eingang in eine Modellstudie, welche zum Ziel hat, den Einfluss von Dränung und präferenziellem Fluss auf Gesamtabfluss und Stoffaustrag abzubilden und die Auswirkungen verschiedener Managementstrategien zu prognostizieren.

**ABSTRACT:** The work focuses on the combination of tile drainage and preferential flow on different scales, which is significant for the diffuse pollution originating from agricultural fields. In the catchment of the brook Zarnow (southeast of Rostock near Dummerstorf), discharges and solute concentrations are measured at a tile drain outlet, in ditches and in the brook. Furthermore, a soil survey is conducted and a digital elevation model is developed. This data is used for hydrological modelling aiming at the depiction of the influence of artificial drainage and preferential flow on the discharge and on the solute export as well as at the prognosis of the effects of different management strategies.

### 1 EINLEITUNG

Die Belastung von Grund- und Oberflächenwasser mit Nährstoffen und Pflanzenschutzmitteln wird maßgeblich durch landwirtschaftliche Flächennutzung verursacht. Während durch die Verbesserung der Reinigungsleistung von Kläranlagen die Belastung durch punktuelle Quellen abgenommen hat, ist die Verminderung der nach wie vor hohen diffusen Einträge (Umweltbundesamt 2000) auch im Hinblick auf die Umsetzung der Europäischen Wasser-Rahmenrichtlinie von entscheidender Bedeutung. In Norddeutschland ist ein großer Anteil der landwirtschaftlichen Nutzflächen gedränt. Die Dränmaßnahmen verursachen einen verkürzten Aufenthalt des Sickerwassers in der biologisch aktiven ungesättigten Zone und somit eine direkte Beeinträchtigung der Oberflächenwasserqualität. Häufig führen darüber hinaus präferenzielle Fließ- und Stofftransportprozesse zu einer unerwartet schnellen Reaktion der Dräne (Lennartz et al. 1999; Kohler et al. 2003). Das über Fließzustände und räumliche physikochemische Heterogenität integrative Signal im Dränabfluss ermöglicht jedoch die Quantifizierung von Transportprozessen im Feldmaßstab, die durch Punktmessungen allein nicht möglich wäre (Wichtmann et al. 1997). Um einen Beitrag zum Verständnis der Auswirkungen landwirtschaftlicher Nutzung auf Wasserhaushalt und Wasserqualität zu leisten, befasst sich das Promotionsvorhaben mit dem Einfluss von Dränabfluss sowie präferenziellem Fluss auf Gesamtabfluss und Stoffaustrag auf mehreren Maßstabsebenen. Dazu erfolgt neben dem Messprogramm eine Modellierung des IST-Zustandes sowie verschiedener Managementszenarien.

### 2 METHODEN

#### 2.1 Untersuchungsgebiet

Das im November 2003 begonnene Promotionsvorhaben ist eng an laufende Untersuchungen des Instituts für Bodenkunde und Pflanzenernährung der Universität Rostock am Standort Dummerstorf (ca. 15 km südöstlich von Rostock) angebunden. Die Datenakquisition im Untersuchungsgebiet ist hierarchisch gegliedert. An einer Drän-

messstation – von einer zweiten, nicht mehr betriebenen, sind Daten verfügbar – wird ein Sammler beprobt, der ca. 4,2 ha Ackerland entwässert. Das fächerförmige Drän-system 1984 ist mit einem Dränabstand von 12 bis 14 m in 1,10 m Tiefe verlegt worden. Diese Sammler münden in einen ebenfalls beprobten Graben, dessen Einzugsgebiet (ca. 180 ha) hauptsächlich durch Ackernutzung (174 ha, davon ca. 140 ha gedränt) geprägt ist. Eine weitere Messstelle liegt an einem Graben, der ca. 48 ha Grünland, teilweise auf Niedermoor, entwässert. Beide Gräben münden in die Zarnow, die ihrerseits zum Einzugsgebiet der Warnow gehört. An der Zarnow befindet sich eine weitere Messstelle, an der ein Teileinzugsgebiet von ca. 16 km<sup>2</sup> erfasst wird.

#### 2.2 Messprogramm und räumliche Daten

Die Dränmessstation ist mit einem automatischen Probennehmer (ISCO-Sampler) sowie einem Venturi-Gerinne und einem Drucksensor zur Durchflussmessung ausgestattet. An den weiteren Probenahmestellen sollen im März 2004 ebenfalls Sampler und Drucksensoren installiert werden; zu Zeit findet je nach Witterungsverhältnissen 2x wöchentlich bis täglich eine manuelle Beprobung und eine Durchflussmessung zur Erstellung von Pegelschlüsselkurven statt. Laboranalytische Untersuchungen des Drän- und Grabenwassers mittels Ionenchromatographie umfassen Nitrat, aber auch andere relevante Anionen (Sulfat, Chlorid) und Kationen (Calcium, Magnesium, Kalium, Natrium). Die Messung des Niederschlags erfolgt mit Hellmann-Niederschlagsmessern. Der Grundwasserstand in einem Dränbeet wird manuell erfasst. Zur räumlichen Charakterisierung des Untersuchungsgebietes finden Drän- und Bodenkartierungen, pedologische Untersuchungen, Orthophotos sowie ein mittels GPS-Vermessung erstelltes digitales Geländemodell Verwendung.

#### 2.3 Modellansätze

Die hydrologische Modellierung wird mit MHYDAS erfolgen (Moussa et al. 2002), einem Modell für landwirtschaftlich genutzte kleine Einzugsgebiete, in dem anthropogene Strukturen wie Gräben und Dränsammler explizit abgebil-

det werden. Das deterministische Modell basiert auf hydrologischen Einheiten anstelle von Rastern. MHYDAS soll dahingehend modifiziert werden, dass der Dränabfluss als schnelle Abflusskomponente – dem Oberflächenabfluss entsprechend – durch Transferfunktionen berechnet und der präferenzielle Fluss durch empirische Ansätze berücksichtigt wird. Das Modellkonzept sieht vor, dass Niederschlag entweder infiltrieren kann oder durch präferenziellen Fluss und Dränung beschleunigt das Grundwasser oder die Dränrohre erreicht. Daraus ergeben sich in der Vorflut drei Abflusskomponenten: der Basisabfluss sowie ein langsamer und ein schneller Dränabfluss. Der schnelle Dränabfluss entspricht dabei dem präferenziellen Fluss, während der langsame Dränabfluss den Matrixfluss, d.h. das „normal“ infiltrierte Niederschlagswasser umfasst. Das Ziel der Modellstudie ist nicht, die Prozesse in einer Dränabteilung oder zwischen zwei Dränrohren exakt abzubilden, sondern die Einflüsse von Dränsystemen und präferenziellem Fluss auf Einzugs- oder Teileinzugsgebietsebene zu erfassen.

## QUELLEN

- Kohler, A., Abbaspour, K.C., Fritsch, M. & Schulin, R. 2003. Using simple bucket models to analyse solute export to sub-surface drains by preferential flow. *Vadose Zone Journal* 2: 68-75.
- Lennartz, B., Michaelsen, J., Wichtmann, W. & Widmoser, P. 1999. Time variance analysis of preferential solute movement at a tile-drained field site. *Soil Science Society of America Journal* 63: 39-47.
- Moussa, R., Voltz, M. & Andrieux, P. 2002. Effects of the spatial organization of agricultural management on the hydrological behaviour of a farmed catchment during flood events. *Hydrological Processes* 16: 393-412.
- Umweltbundesamt 2000. Daten zur Umwelt. 7. Auflage. Berlin: Erich Schmidt Verlag.
- Wichtmann, W., Lennartz, B. & Widmoser, P. 1997. Bromidverlagerung an zwei gedränten Standorten in Schleswig-Holstein. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 161: 121-128.

## 3 ERSTE ERGEBNISSE

Abbildung 1 zeigt die Durchflüsse der beiden Gräben sowie der Zarnow nach einem Starkregenereignis. Während die höchsten Durchflüsse in der Zarnow zu verzeichnen sind, reagieren sowohl Graben mit dem größtenteils gedränten Einzugsgebiet als auch die Zarnow sehr schnell auf Niederschlagsereignisse, während die Abflussspitze beim Graben im Grünland erst einen Tag später auftritt. Trotz des geringen Durchflusses wies der Graben im Grünland bisher die höchsten Konzentrationsschwankungen der untersuchten Stoffe auf.

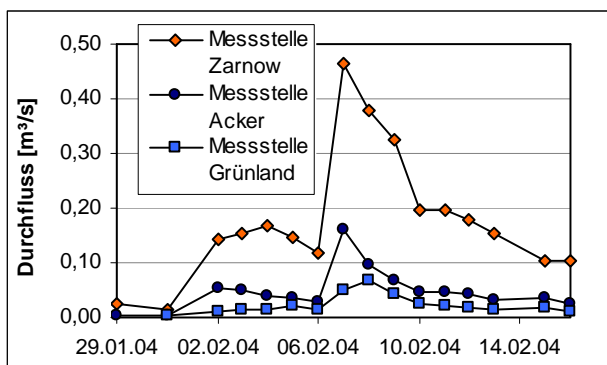


Bild 1: Durchflüsse der Zarnow sowie der Gräben zur Entwässerung von Acker und Grünland nach einem Starkregenereignis

## 4 AUSBLICK

Nachdem die Sammlung von räumlichen Daten weit fortgeschritten und das Messprogramm angelaufen ist, steht neben dessen Fortsetzung und Vervollständigung nun die Weiterentwicklung des konzeptionellen zum lauffähigen Modell und dessen Anwendung auf das Untersuchungsgebiet an. Zur vergleichenden Quantifizierung der Stofffrachten, zur Validierung der Einzugsgebietsabgrenzung und zur Analyse präferenzieller Fließprozesse ist für den Beginn der nächsten Sickerperiode ein Tracerversuch vorgesehen.

# Fermentation von Hydrolysaten aus Getreide-Ganzpflanzen zu Ethanol

DARIUS KAŽEMĖKAS, Hochschule Wismar, Verfahrenstechnik Biogener Rohstoffe

## KURZFASSUNG

Die Produktion von Bioethanol zur Gewinnung von Kraftstoff oder Kraftstoffadditiven wird in Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen. Die Erzeugung von Bioethanol ist jedoch mit hohen Kosten verbunden, die vor allem für die Beschaffung der Rohstoffe aufgewendet werden müssen. Als Rohstoff für die industrielle Gärung kann zucker-, stärke- oder lignocellulosehaltiges Material verwendet werden. Während die Saccharide der zuckerreichen Pflanzen, wie zum Beispiel Zuckerrüben und Zuckerrohr, direkt vergoren werden können, muß die Stärke des Getreides vor der Vergärung durch Amylasen in Glucosemonomere zerlegt werden. Die stärkehaltigen, landwirtschaftlich erzeugten Rohstoffe stehen jedoch nur in beschränktem Umfang für die Bioethanolproduktion zur Verfügung, da sie hauptsächlich als Nahrungs- und Futtermittel genutzt werden. Um die Rohstoffbasis zu erweitern und die Produktionskosten zu senken, empfiehlt sich der Aufschluss lignocellulosehaltigen Materials, zum Beispiel Stroh. Der Produktionsprozess ist jedoch aufwändiger als bei traditionellen Verfahren.

Die Vorteile beider Verfahren können bei der Gewinnung von Bioethanol aus Getreide-Ganzpflanzen genutzt werden, da der Rohstoff leicht zu beschaffen ist und der Produktionsprozess kostengünstig gestaltet werden kann. Bei diesem Verfahren werden die Ligno-cellulose und die Stärke, die in der Gesamtmasse enthalten sind, gemeinsam mithilfe der Dampfexplosion aufgeschlossen, anschließend enzymatisch hydrolysiert und dann mit den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia stipitis* in einem zweistufigen Prozess zu Ethanol vergoren. Um das neue Verfahren wirtschaftlich effektiv gestalten zu können, ist jedoch noch ein hoher Forschungsbedarf erforderlich.

Die Ziele der Forschungsarbeiten, die zu dieser Problematik an der Hochschule Wismar in Zusammenarbeit mit der Universität Rostock laufen, können folgendermaßen zusammengefasst werden:

- •Erstellung eines Modell-Ablaufplans für den Einsatz von Getreide-Ganzpflanzen zur Erzeugung von Bioethanol
- •Prüfung des Dampfexplosionsverfahrens zur Herstellung von Hydrolysaten aus Getreide-Ganzpflanzen
- •Untersuchung des Einflusses der Biomassevorbehandlung mittels Dampfexplosion auf die Fermentierbarkeit von Ganzpflanzen-Hydrolysaten
- •Prüfung der Wirtschaftlichkeit der Ethanolproduktion aus der Getreide-Ganzpflanze unter litauischen Standortbedingungen.

Erste Versuchsergebnisse haben gezeigt, dass Getreide-Ganzpflanzen als Rohstoff zur Bioethanolproduktion geeignet sind. In der Vorhydrolyse konnte ein ausreichend hoher Zuckeranteil für die Fermentation gewonnen

werden. Gleichzeitig entstanden dabei aber auch die Abbauprodukte Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural, die als Inhibitoren die Fermentierbarkeit der Biomasse erschweren. Die optimalen Betriebsbedingungen für die Hydrolyse von Getreide-Ganzpflanzen mit anschließender optimierter Fermentation werden zurzeit untersucht.

# Grundlagenuntersuchungen für eine Technikumsanlage zur Holzverzuckerung

ANDREAS SCHMIDT, Hochschule Wismar

## 1 ALLGEMEINES

Seit der ersten wissenschaftlichen Arbeit von Henri Braconnot aus dem Jahre 1819, wurden weit über 200 Verfahren zur Verzuckerung von Holz entwickelt. Aufgrund vielfältiger apparate- und verfahrenstechnischer Probleme kamen die meisten Verfahren jedoch nicht aus dem Labor- oder Technikumsmaßstab heraus. Zudem konnte keines dieser Verfahren auf die Dauer wirtschaftlich betrieben werden. Deshalb war es das Ziel der vorgelegten Dissertationsschrift, aufbauend auf den in der Literatur veröffentlichten Erfahrungen, im Labormaßstab, Grundlagenuntersuchungen zu einer verbesserten Holzverzuckerung durchzuführen.

Bei der Durchsicht der Literatur kristallisierten sich drei grundsätzliche Möglichkeiten zur Holzverzuckerung heraus. Hierbei handelt es sich um die „Hydrothermalen Verfahren“, die „Enzymatischen Verfahren“ und die „Säureverfahren“. Aufbauend auf diesen Literaturdaten, konnte abgeleitet werden, dass nur die Weiterentwicklung der „Säureverfahren“ wissenschaftlich und wirtschaftlich relevant sein würden, um durch grundlegende Untersuchungen eine Senkung des apparate- und produktionstechnischen Aufwandes zu erreichen, und somit berechnete Chancen zu einer großtechnischen Umsetzung bestehen würden.

Die praktischen Untersuchungen im Rahmen der vorgelegten Arbeit zeigten, dass mit geringem apparativen Aufwand in einem zweistufigen Verfahren Zuckerausbeuten von 50 Gew.-% und mehr, bezogen auf die Holztrockensubstanz, möglich sind. Dazu wird in der ersten Stufe, dem Hochdruckreaktor, die Holzstruktur soweit verändert, dass in der zweiten Stufe, dem Mikrowellenreaktor, die notwendigen Prozesshilfsstoffe leichter in das Holz eindringen und die sich bildenden Holzzucker besser aus dem Holz heraus diffundieren können. Zur Optimierung des entwickelten Verfahrens wurden u.a. Parameter wie Korngröße, Reaktionszeiten und Reaktionstemperaturen untersucht. Aus den gewonnenen Labordaten entstand ein Vorschlag für eine Technikumsanlage. Die vereinfachte betriebswirtschaftliche Betrachtung auf der Grundlage der Laborergebnisse machte jedoch deutlich, dass bei der Weiterführung zukünftiger Forschungs- und Entwicklungsarbeiten dem spezifischen Energieverbräuchen besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden muss. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass aus dem gewonnenen Zuckersubstrat hochwertige Produkte zu entwickeln sind, um mit den bisher auf chemischen Wege hergestellten Grundprodukten betriebswirtschaftlich auf einer Ebene zu stehen.