



Biofilme in Pkw-Klimaanlagen: Ursachenermittlung und Abwehrmaßnahmen

Dr. Klaus Hoppenheidt
Susanne Lehmann
Jadranka Grganovic
Hansjürgen Krist

Auftraggeber

BEHR

Dr. Oliver Mamber
Dr. Jörg Schaper

Impressum

Alle Rechte (insbesondere das Recht der Vervielfältigung und Verbreitung sowie der Übersetzung) sind vorbehalten. Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Kein Teil der bifa-Texte darf in irgendeiner Form ohne Genehmigung der Herausgeber reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme gespeichert, verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Herausgeber
bifa Umweltinstitut GmbH
Am Mittleren Moos 46
86167 Augsburg

Verfasser
Dr. Klaus Hoppenheidt
Susanne Lehmann
Jadranka Grganovic
Hansjürgen Krist

Auftraggeber
Behr GmbH & Co. KG

Gestaltung
Sonja Grazia D'Introno

Druck
EDUCON GmbH

1. Auflage 2009
© bifa Umweltinstitut

Biofilme in Pkw-Klimaanlagen: Ursachenermittlung und Abwehrmaßnahmen

Dr. Klaus Hoppenheidt
Susanne Lehmann
Jadranka Grganovic
Hansjürgen Krist

Auftraggeber
BEHR

Dr. Oliver Mamber
Dr. Jörg Schaper

INHALTSVERZEICHNIS

1	Ausgangssituation	1
2	Ursachenermittlung	3
2.1	Nachweis von Biofilmen in geruchsauffälligen Pkw-Klimaanlagen	3
2.1.1	Mikrobielle Diagnostik von Umweltkeimen.....	3
2.1.2	Ergebnisse von Verdampferuntersuchungen	7
2.2	Nahrungsgrundlage für Biofilme in Pkw-Klimaanlagen	13
2.2.1	Vorüberlegungen	13
2.2.2	Prüfung der Verwertung ausgewählter VOC.....	15
2.2.3	Prüfung der Kohlenmonoxidverwertung.....	17
3	Abwehr von Biofilmen in Pkw-Klimaanlagen	19
3.1	Auswahl geeigneter biozider Wirkstoffe.....	19
3.2	Prüfung biozider Beschichtungen im Behr-Verdampfer-Test	22
3.2.1	Beschreibung des Behr-Verdampfer-Tests.....	22
3.2.2	Wirksamkeit der BEHROXAL NANO®-Beschichtung im Behr-Verdampfer-Test.....	23
3.2.3	Vergleich verschiedener Biozid-beschichteter Verdampfer	26
4	Fazit	29
5	Literatur	30

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

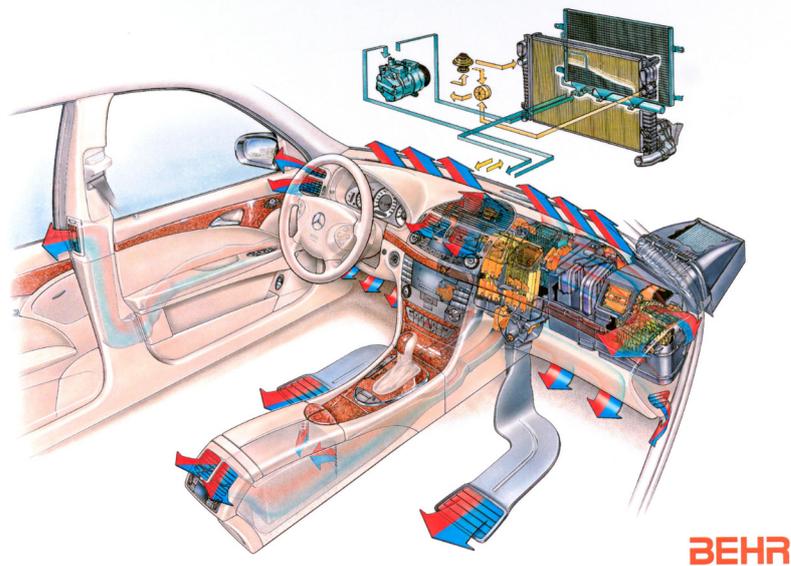
Abbildung 1:	Schema einer modernen Pkw-Klimaanlage	1
Abbildung 2:	Mikrofotografien desselben Bildausschnittes bei Betrachtung im Phasenkontrast (links) und im Auflicht-Fluoreszenzmikroskop nach Anfärbung des Erbmaterials mit Acridinorange (rechts).....	3
Abbildung 3:	Einfluss des Nährbodens (links) und der Bebrütungstemperatur (rechts) auf das Ergebnis der Lebendkeimzahl von Außenluft (Sedimentationsplatten, n. Jörg et al., 1997).....	4
Abbildung 4:	Arbeitsgang der Lebendkeimzahlbestimmung und der Kolonietyp-Auswertung	5
Abbildung 5:	Beispiele für biochemische Identifizierungssysteme für Bakterien; links: API-Streifen mit 32 Substratvarianten für das ATB Plus-System von bioMérieux; rechts: Mikrotiterplatte mit 96 Substratvarianten für das Microlog-System der Firma BIOLOG	5
Abbildung 6:	Arbeitsgang für die Keimidentifizierung mittels 16S-rDNA-Sequenzierung (links) und Datenbestand des Ribosomal Database Projects (rechts).....	6
Abbildung 7:	Schema der mikrobiellen Besiedlung von Oberflächen (nach van Loosdrecht et al., 1990, verändert)	8
Abbildung 8:	Mikrofotografie einer Verdampferlamellenoberfläche	9
Abbildung 9:	Beispielfoto des Koloniemusters bei Lebendkeimzahlbestimmungen.....	11
Abbildung 10:	Nachweishäufigkeit von Bakterien der Gattungen Methylobacterium und Sphingomonas bei Verdampferuntersuchungen	11
Abbildung 11:	Konzentrationen an VOC im Fahrzeuginnenraum bei unterschiedlichen Temperaturen im stehenden Fahrzeug (oben) und Konzentrationsverlauf nach Inbetriebnahme der Lüftung	14
Abbildung 12:	Konzentrationsänderung von CO in Kulturansätzen mit ausgewählten Testkeimen	18
Abbildung 13:	Schema des Arbeitsgangs für die Wirksamkeitsprüfung von Bioziden	19
Abbildung 14:	Ergebnis der Prüfungen ausgewählter Biozidwirkstoffe und den Prüfkeimen Methylobacterium und Sphingomonas (beachte: logarithmisch skalierte Konzentrationsachse).....	20
Abbildung 15:	Ergebnis der Prüfungen von 3 Biozidwirkstoffen mit 8 Pilz- und 8 Bakterienarten.....	21
Abbildung 16:	Foto eines Prüfstücks und des Inkubationsgefäßes	23
Abbildung 17:	Lebendkeimzahlen von Verdampfer-Prüfblöcken nach Beimpfung mit verschiedenen Pilz- und Bakterienarten	25
Abbildung 18:	Ergebnisse im Behr-Verdampfer-Test mit 7 Verdampfertypen von 6 Herstellern	27

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Bedeutung molekularbiologischer Methoden für die Identifizierbarkeit von Umweltkeimen.....	7
Tabelle 2:	Beladung der Oberflächen von 83 Verdampfern mit chemisch oxidierbaren Verbindungen (CSB), mikroskopisch nachweisbaren Zellzahlen und Lebendkeimzahlen auf NAR-Agar bei 25°C.....	9
Tabelle 3:	Kfz-bedingte Immissionskonzentrationen und Grundbelastungswerte; Jahresmittelwerte in $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (LfU, 2003)	13
Tabelle 4:	Mögliche Quellen der Nährelemente für die in Pkw-Klimaanlagen vorkommenden Bakterien	15
Tabelle 5:	Ergebnis der Prüfungen zur VOC-Verwertung durch Bakterien aus Pkw-Klimaanlagen - Auswertung der Trübung (OD) und der Proteinkonzentration (in mg/L) nach Abschluss der Kultivierung.....	16
Tabelle 6:	Matrix der beobachteten Ergebnisvarianten	26

1 Ausgangssituation

Vor rund 50 Jahren begann der Einsatz von Klimaanlagen im Pkw. Heute gehören sie bei den meisten Neufahrzeugen zum Standard. Die Grundfunktionen der früheren Klimaanlagen (Heizen, Kühlen und Entfeuchten) wurden ständig technisch optimiert und den Komfortansprüchen der Nutzer angepasst. High-End-Produkte bieten eine Vierzonenklimatisierung für individuelles Wohlfühlklima im gesamten Fahrgastraum. Frisch- und Umluftfilter bewirken eine Luftverbesserung durch Abscheidung von Partikeln (Ruß, Pollen, Schimmelsporen, Staub) und Gasen (Ozon, Abgase, Gerüche).



Pkw-Klimaanlagen sind kompakte Hochleistungsaggregate. Sie bewirken im Fahrgastraum einen 100- bis 200fachen Luftwechsel in der Stunde. Dabei werden nach DIN 1946-3 bis zu 600 m³ Luft in der Stunde zunächst in Filtern von unerwünschten Stoffen (Staub, Ruß, Pollen, Abgasbestandteile, u.a.) befreit. Die gefilterte Luft wird anschließend in einem Verdampfer genannten Wärmetauscher abgekühlt. Dabei kondensiert ein Teil des in der Luft vorhandenen Wasserdampfes, der als Kondensat ausgeschieden wird. Die entfeuchtete Luft wird anschließend in einem Hezelement auf die gewünschte Temperatur erwärmt und gelangt in den Fahrgastraum.

Abbildung 1: Schema einer modernen Pkw-Klimaanlage

Bei den ersten Klimaanlagen traten nach längerem Gebrauch noch häufiger störende Gerüche auf. Bei modernen Anlagen gibt es bei regelmäßiger Wartung nur noch selten Geruchsprobleme. Doch auch diese Fälle sollen zukünftig vermieden werden. Das bifa Umweltinstitut hat die Behr GmbH & Co. KG bei der Aufklärung der wichtigsten Ursache für störende Gerüche von Pkw-Klimaanlagen und bei der Entwicklung von Klimaanlagen mit einer das Keimwachstum unterdrückenden Ausrüstung unterstützt. Der vorliegende Beitrag fasst ausgewählte Ergebnisse der Entwicklungsarbeiten zusammen.

2 Ursachenermittlung

2.1 Nachweis von Biofilmen in geruchsauffälligen Pkw-Klimaanlagen

2.1.1 Mikrobielle Diagnostik von Umweltkeimen

Obwohl schätzungsweise die Hälfte der globalen Biomasse aller Lebewesen auf Bakterien zurückzuführen ist (Whitmann et al., 1998; Schleifer, 2004), bleiben sie in der natürlichen Umwelt für den Betrachter wegen ihrer geringen Größe von wenigen Mikrometern (μm) meist unsichtbar. Selbst bei der Anwendung von Mikroskopen lassen sich einzelne Bakterien in Umweltproben häufig nur schwer nachweisen, da neben den Bakterien viele andere Partikel vorhanden sind, die eine optische Unterscheidung erschweren.

Da alle Lebewesen und damit auch Bakterien im Unterschied zur unbelebten Materie Erbmateriale in Form von Nukleinsäuren enthalten, gelingt es durch eine selektive Anfärbung des Erbmateriale in den meisten Fällen, die in einer Probe vorhandenen Bakterien sichtbar zu machen. Ein Beispiel zeigt Abbildung 2: Der von der Oberfläche eines Verdampfers einer Pkw-Klimaanlage abgewaschene Biofilm wurde im Lichtmikroskop betrachtet. Bei Lösungen, die ausschließlich Bakterien enthalten, lassen sich die Bakterien im Durchlichtmikroskop unter Nutzung des Phasenkontrastverfahrens immer sehr gut erkennen. Die untersuchte Waschflüssigkeit enthielt dagegen sehr viele andere Partikel, sodass im Phasenkontrastbild allenfalls einzelne Bakterien sichtbar waren. Derselbe Bildausschnitt zeigte dagegen nach Anfärbung des Erbmateriale mit Acridinorange im Auflichtfluoreszenzmikroskop eine große Anzahl und Vielfalt hell-oranger leuchtender Bakterien. Mit an die Aufgabenstellung angepassten mikroskopischen Verfahren gelingt es in den meisten Fällen, die *Zellzahl* der Bakterien (und Pilze) in einer Probe zu ermitteln.

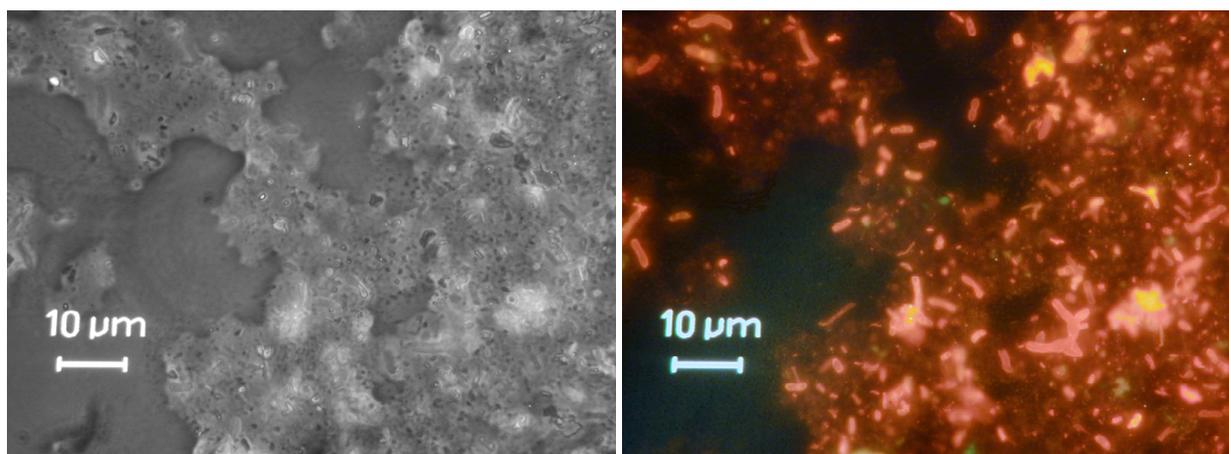


Abbildung 2: Mikrofotografien desselben Bildausschnittes bei Betrachtung im Phasenkontrast (links) und im Auflicht-Fluoreszenzmikroskop nach Anfärbung des Erbmateriale mit Acridinorange (rechts)

Mikroskopische Zellzahlbestimmungen erlauben zwar relativ rasch eine Aussage darüber, ob in einer Untersuchungsprobe Mikroorganismen in großer Anzahl vorhanden sind. In der Regel ist es aber nicht möglich, Aussagen darüber zu machen, welcher Anteil der mikroskopisch nachweisbaren Zellen noch vital und stoffwechselaktiv und welcher Anteil abgestorben ist. Zudem ist es vorteilhaft zu wissen, welche Mikroorganismenarten in der Untersuchungsprobe vorhanden sind.

Zur Beantwortung dieser Frage ist es zielführend, die in der Probe vorhandenen Mikroorganismen auf geeigneten Nährböden unter wachstumsfördernden Kulturbedingungen zu vermehren und Reinkulturen der interessierenden Keime zu gewinnen. Meist sind die Wachstumsansprüche der in der Probe vorhandenen Mikroorganismen aber unbekannt. Ohne längere methodische Optimierungsarbeiten bilden deshalb nur geringe Anteile der in Umweltproben mikroskopisch nachweisbaren Zellen Kolonien auf den Nährböden aus. Durch Variationen der Kulturbedingungen (vergl. Joseph et al., 2003; Davis et al., 2005) gelingt es aber oft, dass mindestens ein zweistelliger Prozentanteil der mikroskopisch nachweisbaren Zellen Kolonien auf den Nährböden ausbildet. So bevorzugen viele Umweltkeime vergleichsweise niedrige Nährstoffkonzentrationen und Wachstumstemperaturen (Abbildung 3)¹. Dadurch bedingt wachsen sie meist nur langsam und bilden oft nur kleine Kolonien auf den Nährböden.

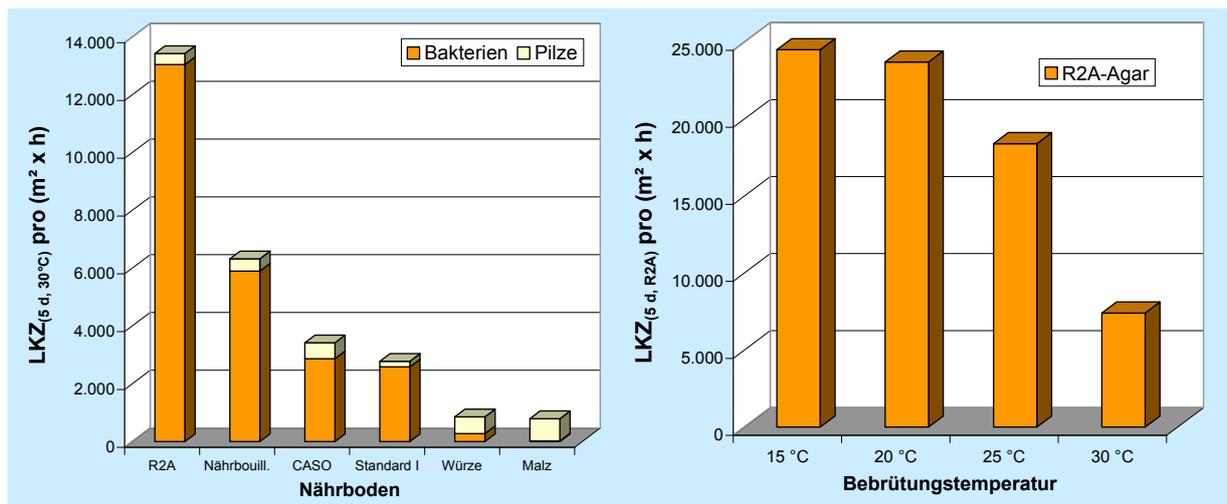


Abbildung 3: Einfluss des Nährbodens (links) und der Bebrütungstemperatur (rechts) auf das Ergebnis der Lebendkeimzahl von Außenluft (Sedimentationsplatten, n. Jörg et al., 1997)

Die Auswertung der Anzahlen an Bakterienkolonien unter den gewählten Kulturbedingungen liefert als Ergebnis die *Lebendkeimzahl (LKZ)*, die nur unter Angabe der jeweiligen Kulturbedingungen aussagekräftig ist². Die Auswertung der visuell unterscheidbaren Kolonievarianten liefert Informationen zur Häufigkeit des jeweiligen Kolonietyps und ermöglicht die Isolation von Reinkulturen der Kolonietypen (Abbildung 4).

¹ Die für den humanmedizinischen Bereich interessanten Krankheitserreger bevorzugen im Unterschied zu vielen Umweltkeimen hohe Nährstoffkonzentrationen und Bebrütungstemperaturen um 37 °C.

² Beispiel: LKZ_(5 d, 30 °C, R2A) bedeutet: Lebendkeimzahl nach fünftägiger Bebrütung bei 30 °C auf R2A-Agar

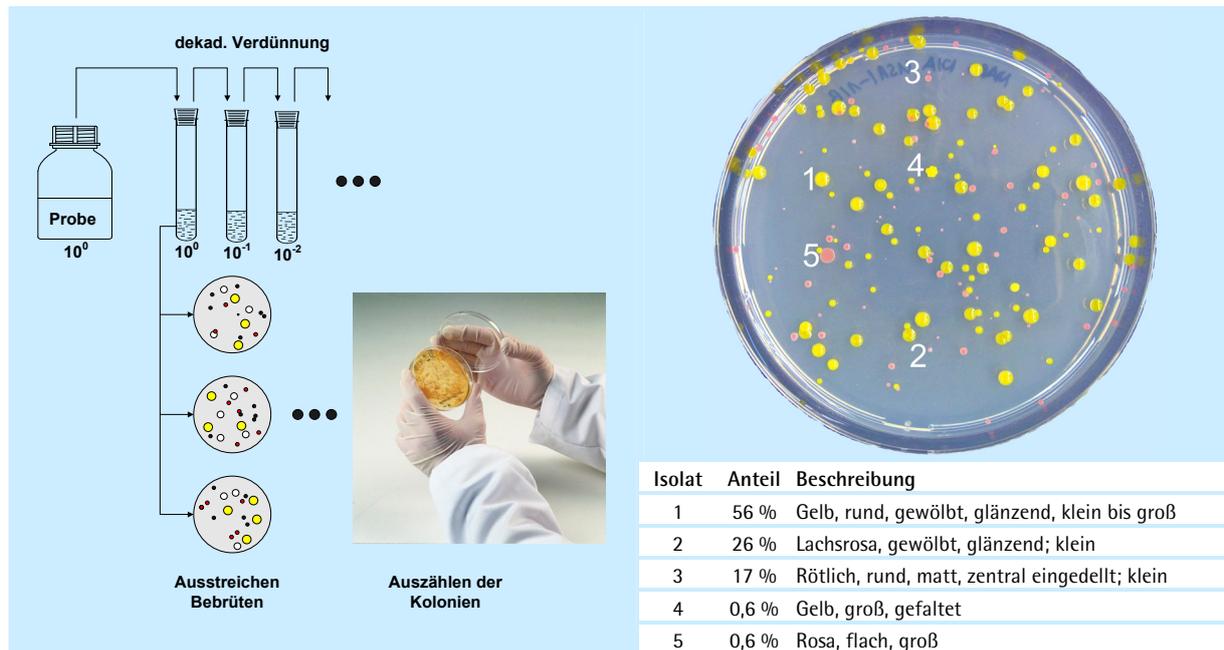


Abbildung 4: Arbeitsgang der Lebendkeimzahlbestimmung und der Kolonietyp-Auswertung

Speziell für die Identifizierung von wichtigen – jedoch nicht allen – humanpathogenen Bakterien werden in der Praxis halbautomatisierte Arbeitshilfen eingesetzt. Die Funktionsweise dieser Identifizierungssysteme basiert darauf, dass das Wachstum des zu identifizierenden Keimisolates mit einer Auswahl unterschiedlicher Wachstumssubstrate geprüft wird (Abbildung 5).

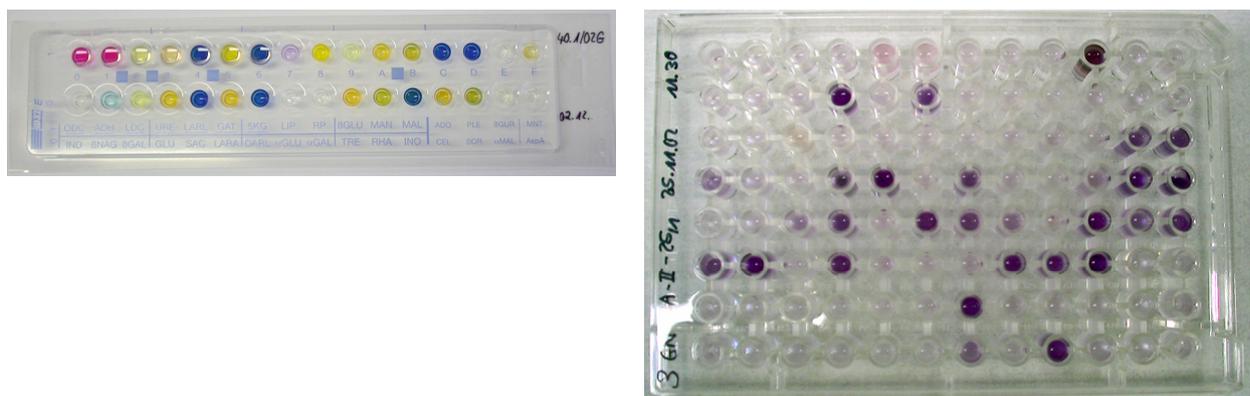


Abbildung 5: Beispiele für biochemische Identifizierungssysteme für Bakterien; links: API-Streifen mit 32 Substratvarianten für das ATB Plus-System von bioMérieux; rechts: Mikrotiterplatte mit 96 Substratvarianten für das Microlog-System der Firma BIOLOG

Das sich bei der Prüfung ergebende Muster an positiven und negativen Wachstumsbefunden wird mithilfe von Datenbanken mit dem Muster von bekannten Keimarten verglichen. Bei vielen klinisch relevanten Keimvarianten haben sich die biochemischen Identifizierungssysteme als hilfreich und hinreichend zuverlässig erwiesen. Die Anzahl der bekannten Krankheitserreger des Menschen ist allerdings

mit rund 1.407 Arten – darunter 307 Pilz- und 538 Bakterienarten – vergleichsweise klein³ (Whoolhouse et al., 2005).

In der Umwelt kommen schätzungsweise einige Millionen Bakterien- und Pilzarten vor (Schleifer, 2002, 2004). Da die meisten Umweltkeime im Labor bislang nicht kultivierbar sind (Zengler, 2008), sind die klassischen biochemischen Identifizierungssysteme für nicht-kultivierbare Keime ungeeignet. Inzwischen wurde allerdings eine molekularbiologische Identifizierungsmethode für Bakterien (und Pilze) entwickelt (Weisburg et al., 1991; Ludwig u. Schleifer, 1994; Woo et al., 2008), mit der es sogar für im Labor nicht kultivierbare Keime möglich ist, ihre systematische Zuordnung mithilfe der partiellen 16S-rDNA-Sequenzierung zu ermitteln. Hierbei wird versucht, die Nukleinsäuresequenz des Gens des Isolates, das die Erbinformation für die 16S-rRNA – einem Bestandteil der für die Proteinsynthese dienenden Ribosomen – kodiert, ganz bzw. teilweise zu entschlüsseln. Der molekulare Aufbau der 16S-rRNA ist artcharakteristisch und gilt als „genetischer Fingerabdruck“, durch dessen Kenntnis eine Zuordnung eines unbekanntes Isolates zu einer bekannten Bakterienart möglich wird.

Bei der Datenbankrecherche wird die Basensequenz der 16S-rDNA des unbekanntes Isolates mit den Basensequenzen von inzwischen mehr als 1,2 Millionen Bakterienisolaten verglichen. Wenn die Basensequenz des Isolates hinreichend mit der Sequenz eines Datenbankeintrages übereinstimmt, liegt eine Identität des Isolates mit einer bekannten Bakterienart vor. Andernfalls handelt es sich bei dem Isolat um eine bislang unbekannte Art. Dieser Fall wird in der Praxis häufig vorkommen, da erst für einen Teil der mehrere Millionen in der Umwelt vorkommenden Bakterienarten Sequenzdaten vorliegen. Der Datenbestand wächst aber rasant an (Abbildung 6)⁴.

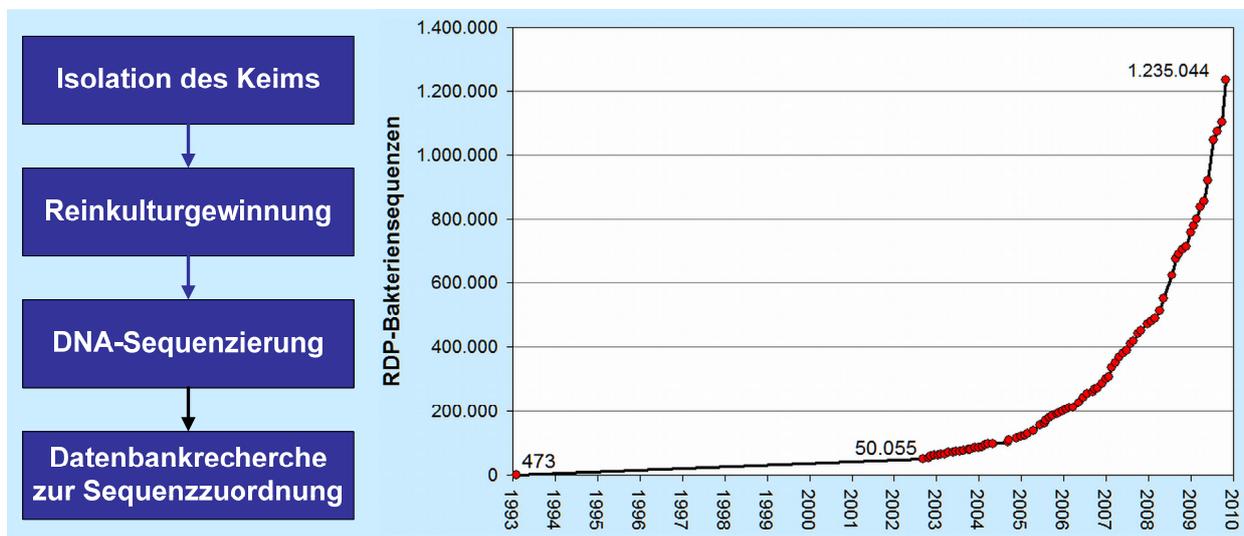


Abbildung 6: Arbeitsgang für die Keimidentifizierung mittels 16S-rDNA-Sequenzierung (links) und Datenbestand des Ribosomal Database Projects (rechts)

³ 208 Viren/Prionen, 538 Bakterien, 317 Pilze; 57 Protozoen; 287 Würmer

⁴ Zum Vergleich: Mit biochemischer Diagnostik können nur rd. 1.900 Keimarten identifiziert werden

Im Vergleich zur biochemischen Keimdiagnostik ist die 16S-rDNA-Diagnostik in mehrfacher Hinsicht vorteilhaft. Sie ist für kultivierbare und nicht kultivierbare Keime anwendbar und mit ihr können bereits heute um mehr als Faktor 500 höhere Keimvarianten unterschieden werden als mit biochemischen Methoden (Tabelle 1). Auch dann, wenn die Basensequenz eines unbekanntes Isolates nicht zu 100 % mit der Sequenz eines Datenbankeintrags übereinstimmt, zeigen sich in der Praxis meist mehr oder weniger große Übereinstimmungen mit Basensequenzen bereits bekannter Keime. Auf dieser Basis ist es möglich, auch für bislang unbekannte Isolate zu klären, ob sie mit bereits bekannten Bakterien näher verwandt sind. Informationen zu den Lebensansprüchen bekannter Bakterienarten können dabei helfen, die Kultivierbarkeit der verwandten, unbekanntes Bakterienarten zu verbessern. Die Weiterzüchtung der aus der Umweltprobe isolierten Kolonietypen ermöglicht es, genau jene Keimvarianten als Prüforganismen für die Auswahl von Keimwachstum hemmenden Maßnahmen zu nutzen, deren Wachstum am Untersuchungsstandort unterbunden werden soll.

Tabelle 1: Bedeutung molekularbiologischer Methoden für die Identifizierbarkeit von Umweltkeimen

Parameter	Bakterien	Pilze	Viren
Nachweisbar mit Kulturverfahren: - Krankheitserreger - Umweltkeime	> 80 % < 0,1 %	> 80 % < 0,1 %	> 80 % selten
Biochemisch identifizierbar: - Krankheitserreger - Umweltkeime	> 70 % < 0,1 %	wenige < 0,1 %	häufig Ausnahmen
Molekularbiologisch identifizierbar: - Krankheitserreger - Umweltkeime	IST / Potenzial ! ~ 90 % / 100 % ~ 30 % / 100 %	IST / Potenzial ! ~ 75 % / 100 % < 20 % / 100 %	IST / Potenzial ! ~ 100 % / 100 % wenige / 100 %

Neben der Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse bietet die 16S-rDNA-Diagnostik noch den Vorteil, dass auch die Sequenzen von unbekanntes Keimen in Datenbanken aufgenommen werden können. Werden bei Folgeuntersuchungen identische Basensequenzen („genetische Fingerabdrücke“) nachgewiesen, ist klar, dass der unbekanntes Keim erneut gefunden worden ist. Biochemische Identifizierungsverfahren lassen für die dem Identifizierungssystem unbekanntes Keime weder Aussagen zu den Verwandtschaftsverhältnissen zu, noch ermöglichen sie eine Archivierung der Daten des unbekanntes Keims.

2.1.2 Ergebnisse von Verdampferuntersuchungen

Mikroorganismen kommen in der Umwelt fast überall vor. Durch physikalische Wechselwirkungen können sie an Oberflächen adsorbiert werden. Falls sie dort günstige Wachstumsbedingungen vorfinden, können sie sich mit unterschiedlichen biologischen Strukturen aktiv auf den Oberflächen verankern und durch Zellteilungen Mikrokolonien bis hin zu ausgeprägten Biofilmen ausbilden (s. Abbildung 7). Es handelt sich dabei um schleimige Strukturen mikrobiellen Ursprungs, in die die Mikroorganismen eingebettet sind (Fleming u. Wingender, 2001; Watnick u. Kolter, 2000).

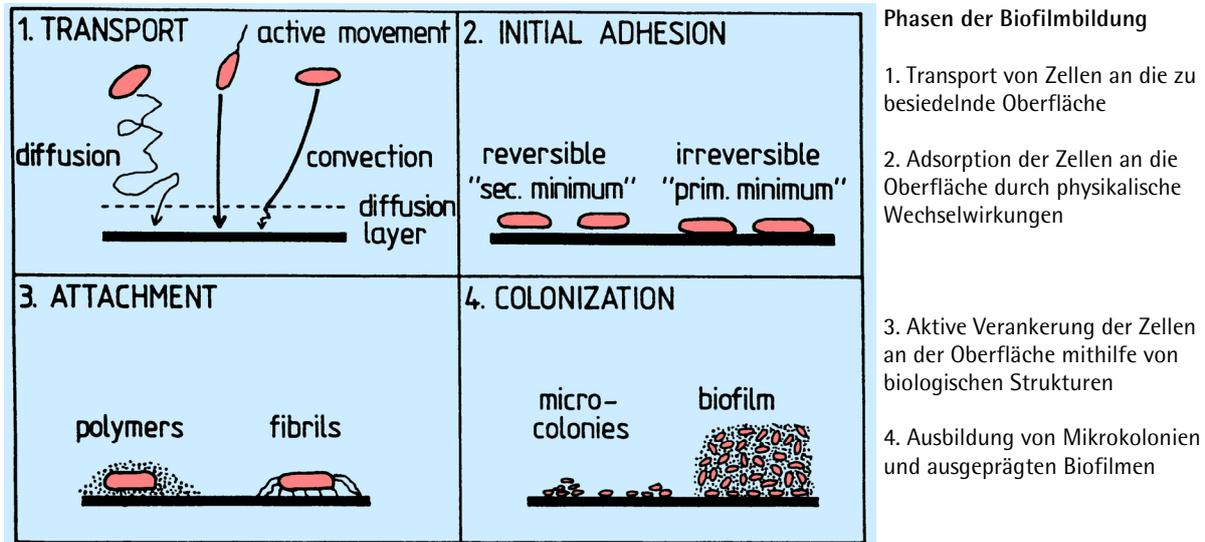


Abbildung 7: Schema der mikrobiellen Besiedlung von Oberflächen (nach van Loosdrecht et al., 1990, verändert)

Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass sich beim Betrieb von Pkw-Klimaanlagen vor allem auf der Oberfläche der Verdampferlamellen Mikroorganismen ansiedeln können. Auch Simmons et al. (1997, 1999) haben auf Verdampferoberflächen eine ausgeprägte mikrobielle Besiedlung nachgewiesen. Im Rahmen verschiedener Untersuchungsprogramme wurde die mikrobielle Besiedlung der Oberflächen der Verdampferlamellen von Pkw-Klimaanlagen untersucht, die in unterschiedlichen Erdregionen im Einsatz gewesen sind. Zu diesem Zweck wurden die Verdampfer unmittelbar nach dem Ausbau in fabrikneue Kunststofftüten verpackt und vor Austrocknung geschützt. Nach dem Eingang im Labor wurden aseptisch Stichproben der Lamellen (2 bis 5 g) aus den Verdampfern herausgeschnitten und mit steriler Natriumpyrophosphatlösung (4,7 g/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, pH 7,0) 60 Minuten bei 25 °C auf dem Horizontalschüttler eluiert. Aliquote des dabei gewonnenen Eluates wurden für unterschiedliche Untersuchungen eingesetzt:

- **Bestimmungen des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB):** Die Gesamtgehalte an chemisch oxidierbaren Stoffen dienen als Indikator für die Verschmutzung der Lamellenoberflächen.
- **Bestimmungen der mikroskopisch nachweisbaren Zellzahl (ZZ):** Im Eluat vorhandene Partikel wurden auf Membranfiltern abgeschieden und die Mikroorganismen wurden mit Acridinorange selektiv angefärbt und gezählt (vergl. Abbildung 2). Hierbei werden vermehrungsfähige und bereits abgestorbene Mikroorganismen summarisch erfasst.
- **Bestimmung der Lebendkeimzahl (LKZ):** Voruntersuchungen und die mikroskopischen Auswertungen zeigten, dass auf den Verdampferoberflächen in der Regel nur Bakterien wachsen. Deshalb wurde für die Lebendkeimzahlbestimmungen ein Nährstoff-reduzierter Agarnährboden⁵ eingesetzt, der vielen in der Umwelt vorkommenden Bakterien gute Wachstumsbedingungen ermöglicht.

⁵ NAR-Agar (pro Liter): Natriumacetat x 3 H₂O: 0,5 g; Glucose x H₂O: 1 g; Pepton aus Casein: 2 g; Proteose-Pepton: 1 g; Fleischextrakt: 1 g; Malzextrakt: 0,5 g; Hefeextrakt: 0,5 g; Ammoniumcitrat: 0,2 g; NaCl: 1 g; K₂HPO₄ x 3 H₂O: 2 g; KH₂PO₄: 1 g; MgSO₄ x 7 H₂O: 0,1 g; Tween 80: 0,5 mL; Agar: 15 g; pH7,0; Bebrütung bei 25 °C über 5 bis 7 Tage

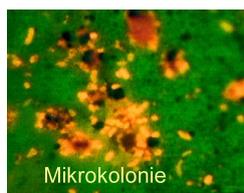
Die Untersuchungen der Oberflächen von 83 Verdampfern aus Fahrzeugen, die in Asien, Nordamerika und Europa verwendet worden sind, führten zu den in Tabelle 2 zusammengefassten Ergebnissen.

Tabelle 2: Beladung der Oberflächen von 83 Verdampfern mit chemisch oxidierbaren Verbindungen (CSB), mikroskopisch nachweisbaren Zellzahlen und Lebendkeimzahlen auf NAR-Agar bei 25°C

	CSB		Zellzahl		Lebendkeimzahl _{NAR, 25°C}	
	mg/g	µg/cm ²	pro g	pro cm ²	pro g	pro cm ²
10%-Perzentil	0,63	9	7,0 x 10 ⁶	9,6 x 10 ⁴	8,7 x 10 ³	1,2 x 10 ²
25%-Perzentil	0,89	12	4,4 x 10 ⁷	5,9 x 10 ⁵	5,4 x 10 ⁵	7,3 x 10 ³
Median	1,44	19	2,4 x 10⁸	3,2 x 10⁶	3,7 x 10⁶	5,0 x 10⁴
75%-Perzentil	2,94	40	4,5 x 10 ⁸	6,1 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁷	1,8 x 10 ⁵
90%-Perzentil	4,99	67	9,8 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁷	4,2 x 10 ⁵
Anzahl	82		83		83	

Die Verdampferlamellen wiesen eine Verschmutzung der Oberflächen mit chemisch oxidierbaren Stoffen von im Mittel 1,4 mg pro Gramm Lamellenmasse bzw. 19 µg pro cm² Lamellenoberfläche auf. Falls es sich dabei um mikrobiell verwertbare Stoffe handelt, würde dieses Nährstoffangebot Bakterien den Aufbau von bis 10⁹ Bakterien pro Gramm Lamellenmasse bzw. bis zu 10⁷ Bakterien pro cm² Lamellenoberfläche ermöglichen. Diese Schätzwerte verdeutlichen, dass bereits geringe Oberflächenverschmutzungen günstige Voraussetzungen für eine intensive mikrobielle Besiedlung schaffen können.

Die Ergebnisse der Zellzahlzählungen lagen im Mittel bei 2,4 x 10⁸ Bakterienzellen pro Gramm Lamellenmasse bzw. 3,2 x 10⁶ Bakterienzellen pro cm² Lamellenoberfläche. Nimmt man für Bakterien eine Trockenmasse von 2 x 10⁻¹⁰ mg an, lässt sich abschätzen, dass auf den Verdampferoberflächen rd. 50 µg Bakterientrockenmasse pro Gramm bzw. 0,65 µg Bakterientrockenmasse pro cm² Lamellenoberfläche vorhanden waren. Diese Abschätzung zeigt, dass die bakterielle Biomasse weniger als fünf Prozent zu der Gesamtmenge an oxidierbaren Stoffen auf der Lamellenoberfläche beigetragen hat. Mehr als 95 % der auf den Lamellenoberflächen vorhandenen oxidierbaren Verschmutzungen wurden nicht durch Bakterienbiomasse verursacht. Lägen die Bakterien auf der Lamellenoberfläche in einer Schicht nebeneinander, würde von ihnen rund ein Zehntel der Lamellenoberfläche bedeckt. Dementsprechend verdeutlichen die Zellzahlresultate, dass die Verdampferlamellen keinen ausgeprägten, mehrlagigen Biofilm sondern eine größere Anzahl von Mikrokolonien gehabt haben können. Diese Einschätzung bestätigten mikroskopische Untersuchungen, bei denen direkt die Verdampferlamellenoberflächen betrachtet worden sind (Abbildung 8). Offensichtlich limitierten das Nahrungsangebot und/oder die physikochemischen Rahmenbedingungen das Ausmaß des Biofilmwachstums.



Mikrofotografie der direkt auf der Verdampferlamelle mit Acridinorange angefärbten Bakterien

Hell-orange Strukturen sind Bakterien, die z.T. in einer Mikrokolonie und z.T. als einzelne Bakterien vorliegen. Dunkle, bräunliche Strukturen sind Schmutzpartikel. Die Lamellenoberfläche erscheint durch Autofluoreszenz grünlich.

Abbildung 8: Mikrofotografie einer Verdampferlamellenoberfläche

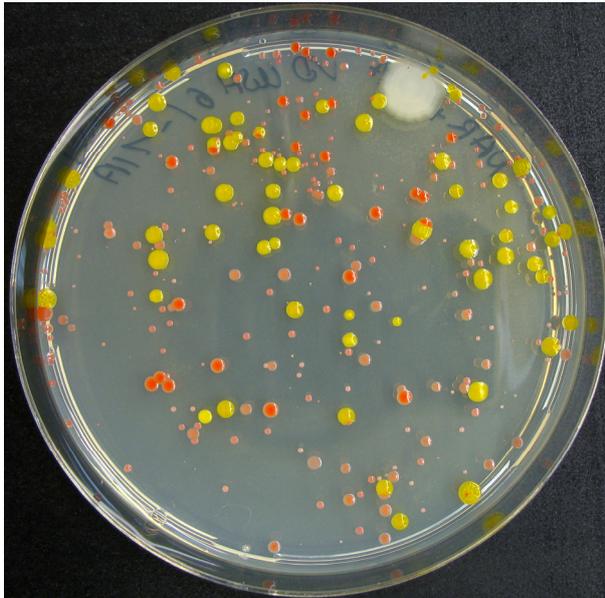
Die auf den Oberflächen der Pkw-Klimaanlagenverdampfer aufwachsenden Mikroorganismen sind stark schwankenden physikochemischen Rahmenbedingungen ausgesetzt. Während des Betriebs der

Klimaanlage wird der Verdampfer auf Temperaturen von etwa 4 °C abgekühlt, so dass auf den Lamellenoberflächen aus der durchströmenden Luft Wasser auskondensiert und von den Lamellenoberflächen als Kondensat abläuft. Im ruhenden Fahrzeug stellen sich in der Klimaanlage jahreszeitlich bedingt sehr unterschiedliche Temperaturen ein. Im Sommer bewirken die hohen Temperaturen ein rasches Durchtrocknen der Klimaanlage und im Winter kann es zur Eiskristallbildung kommen, wodurch die Vitalität der in der Klimaanlage vorhandenen Mikroorganismen nachteilig beeinflusst wird. Dementsprechend ist zu erwarten, dass auf den Lamellenoberflächen immer auch größere Anteile von abgestorbenen Bakterien vorhanden sind, wenn die Probenahme nicht unmittelbar während einer Phase mit günstigen Wachstumsbedingungen für Bakterien erfolgte. In Einzelfällen war dies der Fall und dann stimmten die Ergebnisse der Zellzahl- und der Lebendkeimzahlbestimmungen weitgehend überein. Bei den meisten Untersuchungen lagen die Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmungen jedoch um ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger als die zugehörigen Zellzahlen.

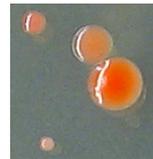
Bei fast allen Lebendkeimzahlbestimmungen ergab sich ein ähnliches Muster von Bakterienkolonien (Abbildung 9): Von wenigen Ausnahmen abgesehen handelte es sich entweder um kleinere, rötlich gefärbte oder um etwas größere, gelb gefärbte Kolonien.

Es wurden aber diverse morphologisch unterscheidbare rötliche und gelbe Kolonien gefunden. Zur Identifizierung der Bakterienarten wurden bei jeder Untersuchungsprobe die drei häufigsten Kolonietypen abgeimpft und Reinkulturen isoliert, deren Identität abschließend mittels 16S-rDNA-Sequenzierung bestimmt wurde. Diese Untersuchungen zeigten, dass es sich bei rötlichen Bakterienkolonien um unterschiedliche Vertreter aus der Gattung *Methylobacterium* handelte, die derzeit 836 genetisch unterscheidbare Varianten umfasst. Die gelben Kolonietypen waren verschiedene Vertreter aus der 1.409 Varianten umfassenden Gattung *Sphingomonas*.

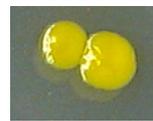
Berücksichtigt man, dass in der Umwelt bereits mehr als eine Millionen Bakterienvarianten gefunden worden sind, erstaunt es, dass auf den Pkw-Klimaanlagenverdampfern nur vergleichsweise wenige Bakterienarten vorkommen. Offenbar schränken das Nahrungsangebot sowie die physikochemischen Rahmenbedingungen in Pkw-Klimaanlagen die Wachstumsmöglichkeiten so stark ein, dass sich hier nur wenige Bakterienarten ansiedeln können. Wie Abbildung 10 verdeutlicht, sind diese Voraussetzungen in verschiedenen Regionen der Welt gleichermaßen gegeben, da vergleichbare Bakterienarten bei allen Proben aus Europa, Asien und den USA gefunden worden sind.



Bei allen Lebendkeimzahlbestimmungen zeigte sich ein vergleichbares Koloniemuster: Von wenigen Ausnahmen abgesehen wurden vor allem kleine, rötlich gefärbte und meist etwas größere gelb gefärbte Kolonien gefunden. Hierbei handelte es sich um verschiedene Vertreter aus den nachfolgend genannten Bakteriengattungen:



Wuchsbild der Kolonien von Vertretern aus der Gattung *Methylobacterium*



Wuchsbild der Kolonien von Vertretern aus der Gattung *Sphingomonas*

Abbildung 9: Beispielfoto des Koloniemusters bei Lebendkeimzahlbestimmungen

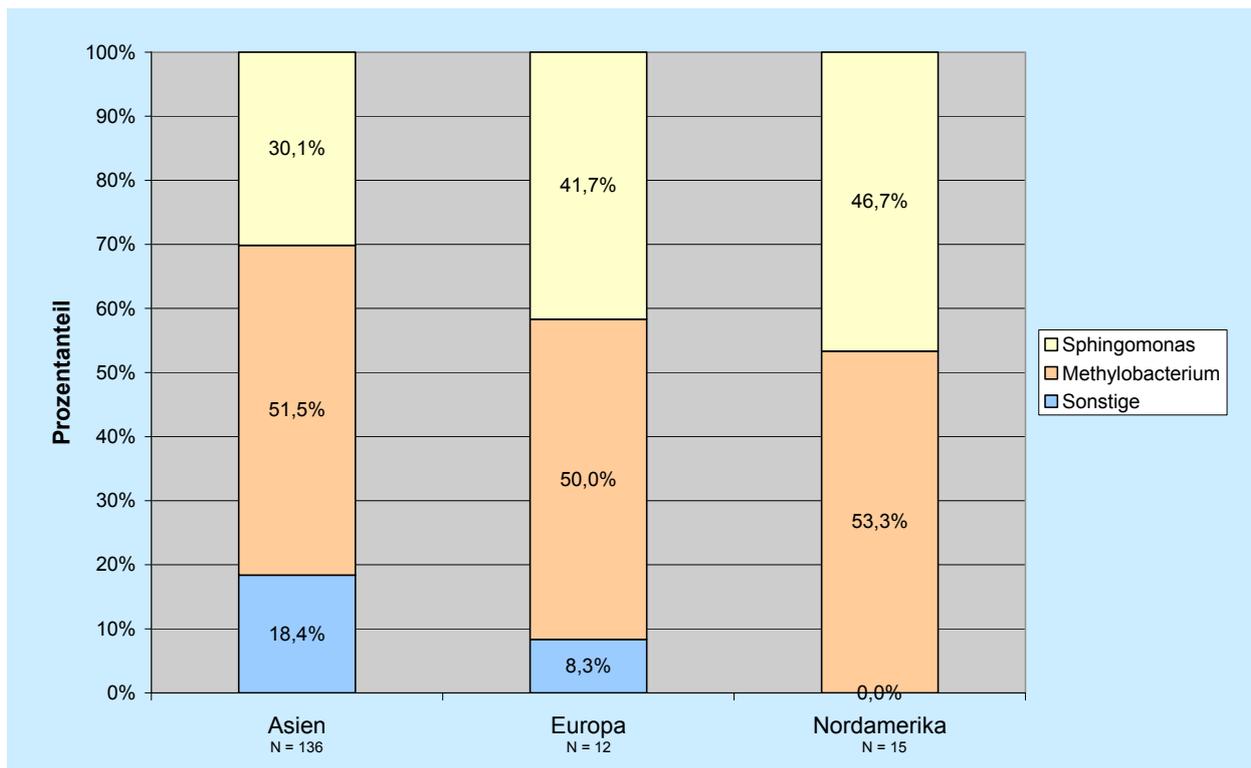


Abbildung 10: Nachweishäufigkeit von Bakterien der Gattungen *Methylobacterium* und *Sphingomonas* bei Verdampferuntersuchungen

Vertreter der Gattungen *Methylobacterium* und *Sphingomonas* sind in der Umwelt weit verbreitete gramnegative, strikt aerobe Bakterien, die ein breites Spektrum organischer Verbindungen als Nahrungsquelle verwenden können. Vertreter der Gattung *Methylobacterium* zeichnen sich zudem dadurch aus, dass sie verschiedene Kohlenstoffverbindungen mit nur einem Kohlenstoffatom (Methanol, Methylamin, ...) als Nahrungsquelle nutzen können.

Bakterien der Gattungen *Methylobacterium* und *Sphingomonas* wurden auch an anderen wechselfeuchten Standorten nachgewiesen (Hugenholz et al., 1995). In diesem Zusammenhang erwähnenswert sind der Nachweis in Trinkwasser (Simões et al., 2007) und gechlortem Trinkwasser (Hiraishi et al., 1995), in Getränkeabfüllanlagen (Timke, et al., 2005), in Wasserversorgungseinrichtungen bei Zahnärzten (Singh et al., 2003), auf Duschvorhängen (Kelley et al., 2004), in Biofiltern zur Abluftreinigung (Lipski et al., 1992; Universität Hamburg, 1994) und sogar in Reinräumen (La Duc et al., 2003). Auch in der Mundhöhle und auf den Füßen des Menschen wurden Vertreter aus der Gattung *Methylobacterium* gefunden (Anesti et al., 2004, 2005).

Hinsichtlich des biologischen Gefährdungspotenzials sind alle derzeit in der TRBA 466⁶ gelisteten *Methylobacterium*-Arten und 37 der 39 gelisteten *Sphingomonas*-Arten der niedrigsten Gefährdungstufe 1 zugeordnet. Die in der TRBA 466 der Risikogruppe 2 zugeordneten Bakterienarten *Sphingomonas parapaucimobilis* und *paucimobilis* wurden in den untersuchten Pkw-Klimaanlagen nicht nachgewiesen.

Die Kenntnis des eingeschränkten Spektrums der in Pkw-Klimaanlagen vorkommenden Bakterienarten bietet gute Voraussetzungen für zielgerichtete Maßnahmen zur Abwehr des unerwünschten Keimwachstums. Besonders hilfreich ist es, wenn – wie nachfolgend beschrieben – die am Standort vorkommenden Bakterien als Testorganismen für die Beurteilung der Optimierungsmaßnahmen zur Verfügung stehen.

⁶ TRBA: Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe

2.2 Nahrungsgrundlage für Biofilme in Pkw-Klimaanlagen

2.2.1 Vorüberlegungen

Da die in Pkw-Klimaanlagen nachgewiesenen Bakterienarten selbst bei Anlagen, die auf unterschiedlichen Kontinenten (Europa, Asien, Nordamerika) im Einsatz waren, weitgehend übereinstimmen, könnte eine mögliche Ursache für das begrenzte Artenspektrum ein selektiv wirkendes Nahrungsangebot für Umweltkeime sein.

Beim Regelbetrieb von Pkw-Klimaanlagen wird Umgebungsluft angesaugt, die durch vorausfahrende Fahrzeuge mit Abgasbestandteilen angereichert sein kann. Ergebnisse aus einem FuE-Verbundprojekt zeigten, dass die in der Abluft eines Straßentunnels vorhandenen Abgasbestandteile (Kohlenwasserstoffe, Kohlenmonoxid und Stickoxide) bei der Passage durch einen Biofilter aus der Luft eliminiert wurden. Mikrobiologische Untersuchungen des Biofiltermaterials führten u.a. zum Nachweis von Vertretern der Gattung *Methylobacterium* (Heinlein, 1994; Universität Hamburg, 1994). In Pkw-Klimaanlagen liegen analoge Bedingungen wie in einem Biofilter vor: Große Luftmengen werden über feuchte Oberflächen (Verdampfer) geführt, auf denen sich Mikroorganismen ansiedeln. Eine Möglichkeit wäre es deshalb, dass die in der Außenluft vorhandenen Abgasbestandteile als Nahrungsquelle für die in Pkw-Klimaanlagen vorkommenden Bakterien dienen.

In der Außenluft kommen die für das Mikroorganismenwachstum benötigten Nährelemente zwar vor (Tabelle 3). Im Jahresmittel sind selbst an verkehrsreichen Straßen nur geringe Konzentrationen an organischen Verbindungen in der Luft vorhanden. Vergleichsweise hohe Werte werden dagegen für das Kohlenmonoxid (CO) in der Außenluft beobachtet. Es ist bekannt, dass das für Menschen giftige Kohlenmonoxid von einigen Bakterienarten als Energiequelle genutzt werden kann (Gremmer et al., 2001). Eine orientierende Untersuchung sollte klären, ob auch die in Pkw-Klimaanlagen vorkommenden Bakterien Kohlenmonoxid (s. 2.2.3) verwerten.

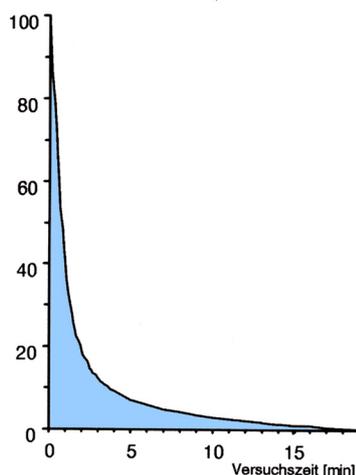
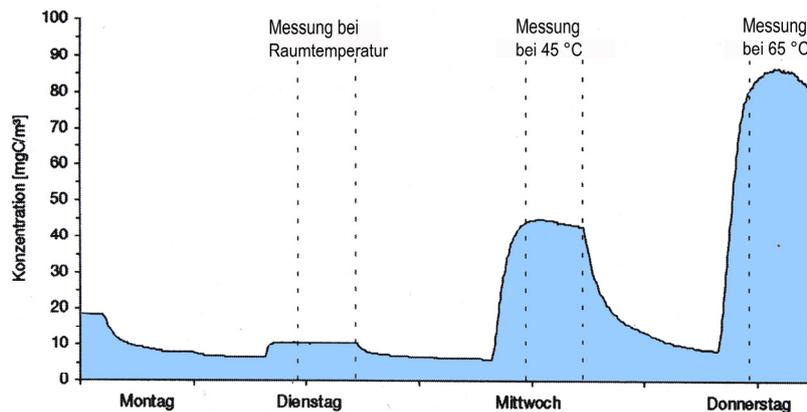
Tabelle 3: Kfz-bedingte Immissionskonzentrationen und Grundbelastungswerte; Jahresmittelwerte in $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (LfU, 2003)

Schadstoffkomponente	Stadtstraßen	Autobahnen	Städtische Grundbelastung	Bundesweite Grundbelastung
Summe organ. Verbindungen*	50 – 100	< 100	50 – 100	< 50
Ruß $\mu\text{g}/\text{m}^3$	4 – 10	3 – 6	2 – 4	< 1
Kohlenmonoxid	1.000 – 2.000	1.000	1.000	< 500
Stickstoffdioxid	30 – 70	30 – 60	30 – 60	< 150
Stickstoffmonoxid	30 – 90	20 – 70	10 – 40	< 10

* ohne Methan

Ergebnisse eines BMBF-Verbundprojektes (BMBF, 1998) zeigten zudem, dass eine sehr große Anzahl von Stoffen aus den Pkw-Werkstoffen in die Innenraumluft eingetragen wird: Schätzungen umfassen ca. 300 leichtflüchtige und ca. 300 schwerflüchtige Verbindungen. Auch bei neueren Untersuchungen wurden hohe Konzentrationen an flüchtigen organischen Verbindungen (VOC) in der Innenraumluft

von Neu- und Gebrauchtfahrzeugen gefunden (Yoshida et al., 2006a, b). Abbildung 11 zeigt den Einfluss der Innenraumtemperatur auf die Luftkonzentration flüchtiger organischer Stoffe. Ohne Luftaustausch stieg die Konzentration flüchtiger organischer Verbindungen im Innenraum bei hohen Temperaturen rasch um bis zu Faktor 1.000 auf Werte von über 90 mg/m³. Da Pkw-Klimaanlagen aus regelungstechnischen Gründen bei Fahrtantritt den Umluftmodus nutzen, gelangen die flüchtigen, organischen Verbindungen mit der Innenraumluft in die Klimaanlage. Dort können die VOC im Kondensat und auf den kalten Verdampferoberflächen abgeschieden werden und den dort vorkommenden Bakterien als Nahrung dienen. Wie Abbildung 11 zeigt, sinken die VOC-Konzentrationen im Innenraum nach Inbetriebnahme der Lüftungsanlage rasch ab, da das etwa 2-3 m³ umfassende Volumen des Fahrzeuginnenraums stündlich mit etwa 200 m³ (bis zu maximal 600 m³) Luft durchspült wird. Bereits nach 20 Minuten ist die Konzentration an flüchtigen organischen Verbindungen auf unter 2 mg/m³ abgesunken. Bei hohen Außentemperaturen werden Pkw-Klimaanlagen jedoch zu 80 % im Umluftmodus betrieben, so dass vergleichsweise große Mengen an VOC aus dem Innenraum in die Klimaanlage gelangen.



Oben: Ein Fahrzeug wurde in einer Prüfkammer verschiedenen Temperaturen und einem geringen Luftwechsel von 0,6 h⁻¹ ausgesetzt und der Einfluss auf die Gesamtkonzentration an VOC verfolgt. Nach der Messung wurde jeweils die Luft im Innenraum ausgetauscht.

Links: Konzentrationsverlauf in Prozent des Ausgangswertes nach Inbetriebnahme der Lüftung.

Quelle: BMBF, 1998, verändert

Abbildung 11: Konzentrationen an VOC im Fahrzeuginnenraum bei unterschiedlichen Temperaturen im stehenden Fahrzeug (oben) und Konzentrationsverlauf nach Inbetriebnahme der Lüftung

Mehr als 98 % der Biomasse (Feuchtmasse FM) von Bakterien geht auf nur sechs Elemente zurück. Für die in Pkw-Klimaanlagen wachsenden chemoorganotrophen Bakterien wurden die in Tabelle 4 auf-

geführten möglichen Quellen für die Nährelemente identifiziert. Mit den nachfolgend skizzierten Untersuchungen wurde geklärt, welche der in Pkw-Klimaanlagen eingetragenen Verbindungen als Nahrungsquelle für die dort gefundenen Bakterien in Frage kommen. Wichtige Voraussetzungen für mikrobielles Wachstum sind neben der Verfügbarkeit von Wasser und geeigneten Nährstoffen für Lebewesen vorteilhafte physikochemische Rahmenbedingungen (pH, Temperatur, Salzgehalt, ...).

Tabelle 4: Mögliche Quellen der Nährelemente für die in Pkw-Klimaanlagen vorkommenden Bakterien

Element	% der FM	Mögliche Quellen
C	10	VOC; CO; (CO ₂)
O	75	O ₂ ; H ₂ O; VOC
H	10	H ₂ O; VOC, Anorganik
N	2 - 2,8	NH ₃ ; NO _x ; (N ₂); N-VOC
P	0,6	Phosphat
S	0,2	Sulfat

VOC: volatile organic compounds = flüchtige, organische Verbindungen

2.2.2 Prüfung der Verwertung ausgewählter VOC

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde überprüft, ob die aus geruchsauffälligen Pkw-Klimaanlagen isolierten Mikroorganismen ausgewählte flüchtige organische Verbindungen als alleiniges Wachstums-substrat verwenden können (Müller, 2008). Hierbei wurden VOC eingesetzt, die nach Literaturlauswertungen und Messungen der Behr GmbH & Co. KG besonders häufig und in höheren Konzentrationen in der Innenraumluft von Pkw nachgewiesen worden sind. Für die Abbauprüfungen wurden zwei aus Pkw-Klimaanlagen gewonnene Reinkulturen (*Methylobacterium aminovorans*; *Sphingomonas* sp. MG49) sowie eine Mischkultur aus einem Verdampfereluat in ein Mineralmedium (Brunner et al., 1980) geimpft. Als Kulturgefäße dienten luftdicht verschraubte 300-mL-Kulturkolben, die 100 mL Medium sowie 0,1 mL des jeweiligen VOC enthielten. Von Kohlenmonoxid wurden 100 mg und von Abgas eines Benzinmotors 100 mL zu jedem Ansatz dosiert. Die Kulturansätze wurden fünf Wochen bei 25 °C auf dem Schüttler (100 rpm) bebrütet. Anschließend wurde visuell das an der Trübung des Mediums erkennbare Keimwachstum sowie die resultierende Proteinkonzentration ausgewertet (Tabelle 5).

Die von Verdampferlamellen eluierte Mischkultur war in der Lage 16 der 18 geprüften VOC als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle für das Wachstum zu nutzen. Lediglich für Acetaldehyd und Kohlenmonoxid waren die Befunde nicht eindeutig, da nur eine minimale Trübung des Kulturmediums und geringe Proteinkonzentrationen gefunden wurden.

Die aus Pkw-Klimaanlagen isolierten Reinkulturen konnten zehn (*Methylobacterium aminovorans*) bzw. fünf (*Sphingomonas* sp. MG49) der 20 geprüften Substrate eindeutig als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle für ihr Wachstum nutzen. Zusammen waren sie in der Lage 13 der 20 geprüften Substrate (= 65 %) für das Wachstum zu nutzen. Weder *Methylobacterium aminovorans* noch *Sphingomonas* sp. MG49 zeigten jedoch mit Kohlenmonoxid und den Abgaskomponenten ein eindeutiges Wachstum. Da in Pkw-Klimaanlagen zahlreiche Vertreter dieser Gattungen zeitgleich vorkommen können und zudem noch Vertreter anderer Bakterienarten vorhanden sind, ist es plausibel,

dass die aus einem Verdampfer eluierte Mischkultur das umfangreichste Spektrum an VOC verwertet hat.

Tabelle 5: Ergebnis der Prüfungen zur VOC-Verwertung durch Bakterien aus Pkw-Klimaanlagen - Auswertung der Trübung (OD) und der Proteinkonzentration (in mg/L) nach Abschluss der Kultivierung

VOC	Mischkultur		Methylobacterium sp.		Sphingomonas sp.	
	OD	Protein	OD	Protein	OD	Protein
Methanol	+++	91	++	147	0	< 1
Ethanol	+++	155	++	118	(+)	< 1
1-Butanol	+++	167	+ bis ++	4,6	++	348
Aceton	+++	131	+	< 1	0	< 1
Acetaldehyd	(+)	4,9	(+)	1,5	(+)	< 1
Cyclohexanon	+++	136	+	2,3	0	< 1
Methylisobutylketon	++	32	+	1,8	(+)	< 1
n-Hexan	++	44	+	1,5	++	368
n-Nonan	++	30	0	< 1	(+)	< 1
n-Decan	++	75	0	< 1	++	316
n-Undecan	++	44	0	< 1	+	19
n-Dodecan	++	35	0	< 1	+	26
Methylcyclopentan	+	5,7	+	1,4	(+)	< 1
Ethylbenzol	+	7,1	(+)	1,5	0	< 1
Xylol	+	4,7	(+)	1,2	0	< 1
Toluol	+	5,5	(+)	1,3	(+)	1,0
Limonen	+	9,8	+	1,7	(+)	1,0
Phthalat DEHP	++	28	+	1,1	(+)	< 1
CO	(+)	5,5	(+)	2,4	0	1,1
Abgas	--	--	0	1,4	(+)	1,3
neg. Kontrolle	--	--	0	1,0	0	< 1

+++ : starke Trübung; ++ : deutliche Trübung; + : schwache Trübung; (+) : minimale Trübung; 0 : keine Trübung visuell wahrnehmbar; -- : nicht geprüft

Diese Befunde bestätigen, dass die in Pkw-Innenräumen regelmäßig und z.T. in hohen Konzentrationen nachweisbaren VOC als Nahrungsquelle für die in Pkw-Klimaanlagen vorkommenden Bakterien dienen können. Dementsprechend sollte der Eintrag dieser Verbindungen in Pkw-Klimaanlagen möglichst vermieden werden, um die Wachstumsbedingungen für diese Bakterien einzuschränken.

Ein Teil der geprüften VOC's ist auch im Abgas von Fahrzeugen vorhanden (Wiedemann et al., 2000), so dass auch über die Außenluft mikrobiell verwertbare organische Stoffe in die Pkw-Klimaanlagen gelangen können. Die Konzentrationen organischer Stoffe sind in der Außenluft allerdings vergleichsweise gering, doch werden beim Betrieb von Pkw-Klimaanlagen relativ hohe Luftdurchsätze und dem-

entsprechend hohe Frachten an Luftbestandteilen erreicht: Nimmt man Gesamtkohlenwasserstoffkonzentrationen von $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und einen Luftdurchsatz von $600 \text{ m}^3/\text{h}$ an, ergeben sich rechnerisch Einträge von 60 mg Kohlenwasserstoffen pro Stunde. Aufgrund der zu erwartenden Stoffvielfalt würden für einzelne Kohlenwasserstoffverbindungen aber nur sehr kleine Frachten erreicht. Im Vergleich dazu ergäben sich für Kohlenmonoxideinträge über die Außenluft hohe Frachten von bis zu $1.200 \text{ mg}/\text{h}$. Deshalb wurden Bakterien aus Pkw-Klimaanlagen ergänzend hinsichtlich einer Kohlenmonoxidverwertung geprüft.

2.2.3 Prüfung der Kohlenmonoxidverwertung

Der biologische Abbau von Kohlenmonoxid wurde mit unterschiedlichen Mikroorganismen untersucht⁷:

- *Hydrogenophaga pseudoflava* (DSM 1084) diente als Referenzbakterium, das bekanntermaßen mit Kohlenmonoxid als alleiniger Energiequelle rasch wächst.
- *Methylobacterium* sp. SKJH-15 und *Sphingomonas* sp. MG49 waren zwei aus Pkw-Klimaanlagen isolierte Bakterien
- eine aus einer Pkw-Klimaanlage gewonnene Mischkultur

In 500 mL Schraubdeckel-Kulturflaschen wurden 25 mL einer mineralischen Nährlösung⁸ mit dem jeweiligen Bakterium beimpft. Der Gasraum der Kulturflaschen war mit einer Mischung aus 80% Luft und 20% Kohlenmonoxid gefüllt. Die Kulturansätze wurden anschließend bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Horizontalschüttler bebrütet. In einem Vorversuch war ermittelt worden, dass alle Bakterien in dem mineralischen Kulturmedium mit Natriumacetat als Energiequelle rasch heranwuchsen und dass Kohlenmonoxidanteile von 20% in der Gasphase nicht hemmend wirken.

In Abbildung 12 ist das Resultat der Überprüfung zusammengefasst: Beim mit *Hydrogenophaga* beimpften Kulturansatz war eine rasche Abnahme der Kohlenmonoxidkonzentration zu beobachten. Parallel dazu stieg die als Biomasseindikator genutzte Proteinkonzentration auf den 18fachen Wert des Ausgangswertes an. Bei allen anderen Ansätzen blieben die Kohlenmonoxid- und die Biomassekonzentration über den gesamten Zeitraum von 22 Tagen unverändert.

Die aus Pkw-Klimaanlagen gewonnenen Bakterien zeigten dementsprechend keine Verwertung von Kohlenmonoxid, sodass diese in vergleichsweise hohen Mengen verfügbare Außenluftkomponente keine relevante Energiequelle für die aus Pkw-Klimaanlagen isolierten Bakterien ist.

⁷ Federspiel, G. (2008): Bericht zum Praxissemester am bifa Umweltinstitut. FH Augsburg (unveröffentlicht)

⁸ http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium133.pdf; das Medium 133 wurde für chemoautotrophes Wachstum mit $2,5 \text{ g/L}$ NaHCO_3 versetzt

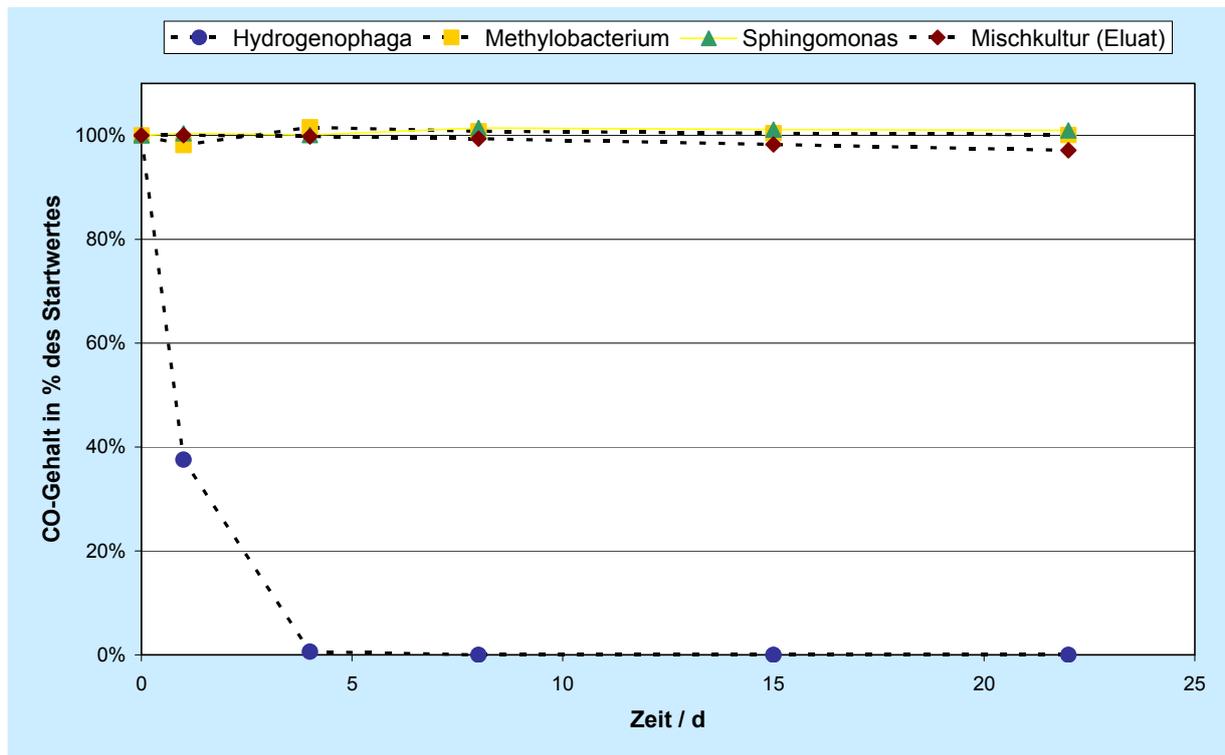


Abbildung 12: Konzentrationsänderung von CO in Kulturansätzen mit ausgewählten Testkeimen

3 Abwehr von Biofilmen in Pkw-Klimaanlagen

Nachdem geklärt werden konnte, dass die in Pkw-Klimaanlagen vorkommenden Mikroorganismen in erster Linie Vertreter aus den Bakteriengattungen *Methylobacterium* und *Sphingomonas* sind, die ein breites Spektrum organischer Verbindungen als Nahrungsquelle nutzen können, sollte geprüft werden, ob sich durch den Einsatz von Biozid ausgerüsteten Beschichtungen eine wirkungsvolle Reduktion des Bakterienwachstums erzielen lässt. Zu diesem Zweck wurden die für den Einsatzzweck zur Verfügung stehenden bioziden Wirkstoffe mit einem einfachen Screening hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen *Methylobacterium* und *Sphingomonas* untersucht. Die drei wirksamsten Wirkstoffe wurden anschließend noch hinsichtlich ihres Wirkpotenzial mit einem breiten Spektrum von Bakterien und Pilzen überprüft (s. 3.1). Das dabei ausgewählte Biozid wurde anschließend in Beschichtungen für Verdampfer eingearbeitet und mit einem speziell entwickelten Prüfsystem wurde untersucht, wie wirksam das ausgewählte Biozid in der realen Verdampferbeschichtung ist. Hierbei kamen Segmente von Prototyp-Verdampfern sowie von anderen am Markt verfügbaren Vergleichsverdampfern zum Einsatz (3.2).

3.1 Auswahl geeigneter biozider Wirkstoffe

Für das Screening der Wirksamkeit der bioziden Wirkstoffe wurden diese in Wasser verdünnt. Anschließend wurde aus jeder Verdünnungsstufe 1 mL entnommen und zu 9 mL einer mit dem jeweiligen Prüfkeim beimpften NAR-Bouillon dosiert. Zur Kontrolle wurden unbeimpfte Ansätze mitgeführt, damit eine durch den Wirkstoff hervorgerufene Trübung erkennbar war. Die beimpften Ansätze enthielten Anfangs 10^4 Zellen des Prüfkeims pro Milliliter. Wenn die Biozidkonzentration oder die -wirksamkeit unzureichend waren, vermehrten sich die Prüfkeime und erzeugten ab etwa 10^6 Zellen/mL eine visuell wahrnehmbare Trübung.

WK	Biozidverdünnung								
	...	1:64	1:32	1:16	1:8	1:4	1:2	unv.	
:	1 mL ↓	1 mL ↓	1 mL ↓	1 mL ↓	1 mL ↓	1 mL ↓	1 mL ↓	1 mL ↓	
Sterilkontrolle	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	← 1 mL steriles Reinstwasser
A-Reihe	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	← 1 mL Impfsuspension
B-Reihe	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	← 1 mL Impfsuspension

⊗: Reagenzglas mit 9 mL steriler NAR-Bouillon; unv.: unverdünnt; WK: Wachstumskontrolle

Grün schattiert: Ansätze ohne Trübung durch Biomasse; orange schattiert: durch Mikroorganismenbiomasse getrübe Ansätze bei unzureichender Biozidkonzentration bzw. -wirksamkeit

Abbildung 13: Schema des Arbeitsgangs für die Wirksamkeitsprüfung von Bioziden

Nach einer Bebrütung bei 30 °C über bis zu zehn Tage wurde die durch Mikroorganismenwachstum hervorgerufene Trübung der Ansätze kontrolliert. Ausgewertet wurde, ab welcher Biozidkonzentration keine durch Mikroorganismenwachstum hervorgerufene Trübung visuell mehr wahrnehmbar war.

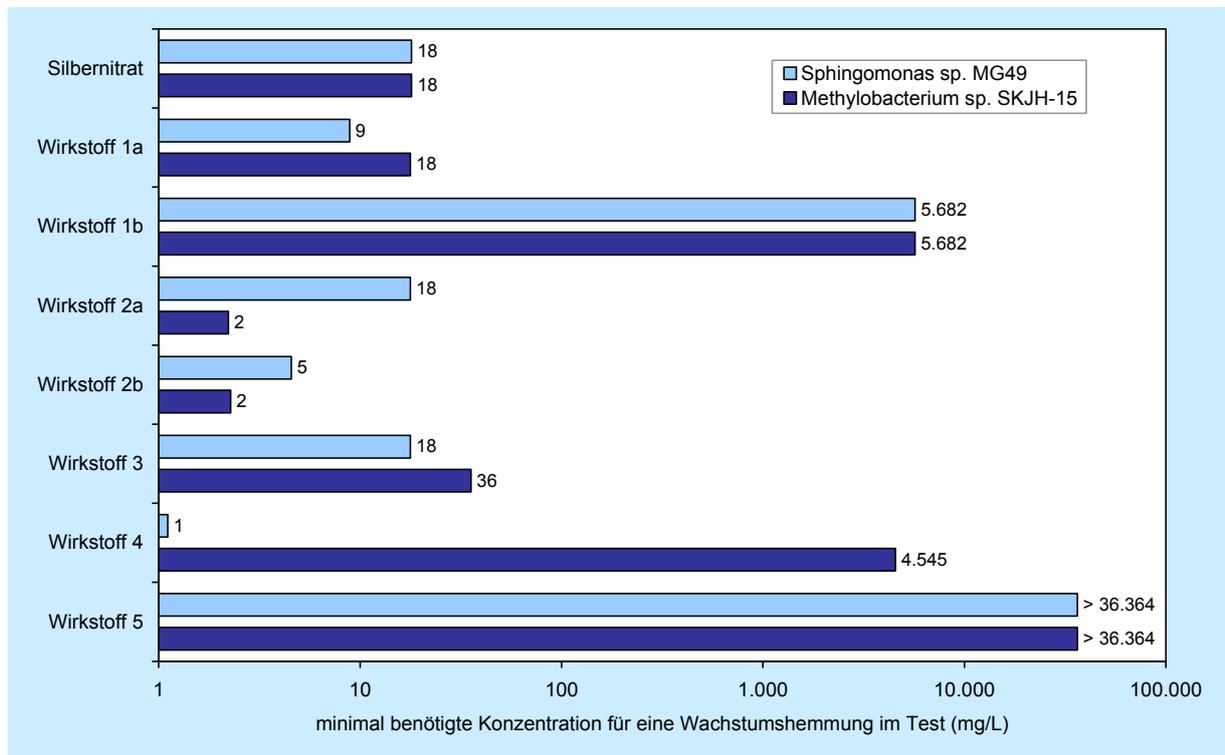


Abbildung 14: Ergebnis der Prüfungen ausgewählter Biozidwirkstoffe und den Prüfkeimen *Methylobacterium* und *Sphingomonas* (beachte: logarithmisch skalierte Konzentrationsachse)

In einem ersten Screening sind die für den Einsatzzweck zur Verfügung stehenden Formulierungen biozider Wirkstoffe mit den aus Pkw-Klimaanlagen isolierten Prüfkeimen *Methylobacterium* sp. SKJH 15 und *Sphingomonas* sp. MG49 untersucht worden. Die in Abbildung 14 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass das als Referenz mitgeführte Silbernitrat ab einer Konzentration von 18 mg/L das Wachstum der beiden Prüfkeime verhinderte. Der Wirkstoff 1 erwies sich in der Formulierung 1a ähnlich wirksam wie Silbernitrat. Im Gegensatz dazu erwies sich eine andere Formulierung desselben Wirkstoffs (1b) erst bei sehr hohen Konzentrationen als biozid wirksam. Die beiden Formulierungen der Wirkstoffs 2 sowie das Produkt mit dem Wirkstoff 3 hemmten das Wachstum der beiden Prüfkeime ebenfalls sehr gut. Im Unterschied dazu erwies sich der Wirkstoff 4 nur gegenüber *Sphingomonas* als hochgradig biozid; *Methylobacterium* wurde erst bei mehr als 4.500fach höheren Konzentrationen im Wachstum gehemmt. Der Wirkstoff 5 hemmte das Wachstum der Prüfkeime selbst bei der maximal geprüften Konzentrationen von 36 Gramm pro Liter nicht.

Drei gegenüber *Sphingomonas* und *Methylobacterium* sehr gut wirksame Produkte (Wirkstoffe 1a, 2b und 3) wurden für eine weitergehende Untersuchung ausgewählt. Das Produkt mit dem Wirkstoff 2a wurde trotz guter Wirksamkeit aussortiert, da es eine für den Anwendungszweck zu hohe Wasserlöslichkeit hatte. Geprüft wurde, inwieweit die drei ausgewählten Wirkstoffe das Wachstum von weiteren Prüfkeimen verhindern. Zum Einsatz kamen neben *Methylobacterium* und *Sphingomonas* sechs weitere Bakterienarten sowie acht Pilzarten. Die Auswahl umfasste dabei Keimarten, die vorzugsweise im asiatischen Raum für die Bewertung der bioziden Wirksamkeit von Verdampferbeschichtungen verwendet werden. Die Ergebnisse dieser Prüfungen sind in Abbildung 15 zusammengestellt.

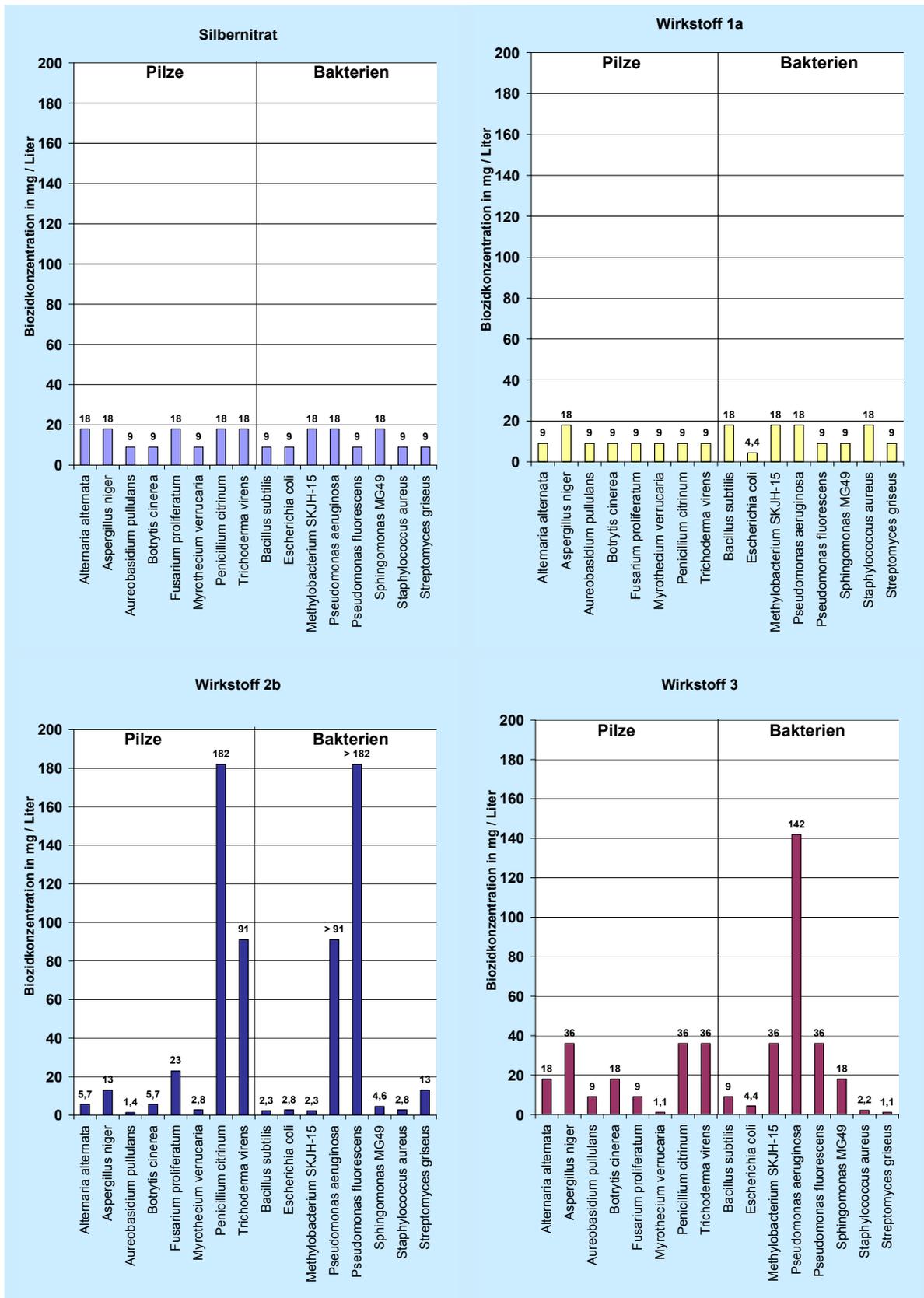


Abbildung 15: Ergebnis der Prüfungen von drei Biozidwirkstoffen mit acht Pilz- und acht Bakterienarten

Das als Referenzbiozid mit breitem Wirkungsspektrum mitgeführte Silbernitrat hemmte das Wachstum aller Prüfkeime ab einer Konzentration von 18 mg/L. Eine massenbezogene vergleichbare Wirkung auf alle eingesetzten Prüfkeime hatte der Biozidwirkstoff 1a.

Mit dem Biozidwirkstoff 3 wurden nur bei zehn der 16 geprüften Keime mit Konzentrationen unter 20 mg/L eine Hemmung des Wachstums beobachtet. Bei 5 Prüfkeimen waren 36 mg/L des Biozids für eine Wachstumshemmung notwendig. Beim Prüfkeim *Pseudomonas aeruginosa* lag die notwendige Wirkkonzentration sogar bei 142 mg/L für diesen Biozidwirkstoff.

Der Wirkstoff 2b zeigte eine recht unterschiedliche Hemmwirkung. Während bei den Bakterienarten *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas aeruginosa* keine hemmende Wirkung erkennbar wurde und ebenso die Pilze *Penicillium citrinum* und *Trichoderma virens* nur bei sehr hohen Konzentration von 182 mg/L bzw. 91 mg/L während des Versuchszeitraumes von sieben Tagen sicher im Wachstum gehemmt werden konnten, war die Wirkung gegenüber den restlichen Prüfkeimen relativ gut. Sie lag weitestgehend in der Größenordnung von Silbernitrat oder darunter. Der Wirkstoff 2b war ab einer Konzentration von ca. 45 mg/L unter Versuchsbedingungen nur noch zum Teil löslich. Dies bedeutet, dass höhere Wirkstoffdosierungen kein weiteres Ansteigen der gelösten Wirkstoffmenge erzielen, so dass sedimentierte Wirkstoffanteile nicht auf die in der Kulturlösung suspendierten Keime einwirken können.

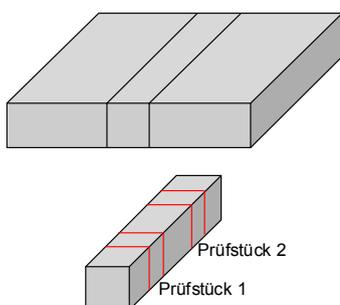
Auf Basis dieser Befunde wurde der Wirkstoff 1a für die Entwicklung einer biozid wirksamen Beschichtung für Verdampferoberflächen ausgewählt. Der Beschichtungsaufbau wurde von der Firma Behr unter dem Namen BEHROXAL NANO[®] markenrechtlich geschützt. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Beschichtung wurde das nachfolgend beschriebene Prüfsystem entwickelt. Da sich der Wirkstoff 1a gegenüber den geprüften acht Pilz- und acht Bakterienarten vergleichbar wirksam erwiesen hatte, wurde bei den weitergehenden Arbeiten nur noch eine Auswahl der Prüfkeime eingesetzt.

3.2 Prüfung biozider Beschichtungen im Behr-Verdampfer-Test

3.2.1 Beschreibung des Behr-Verdampfer-Tests

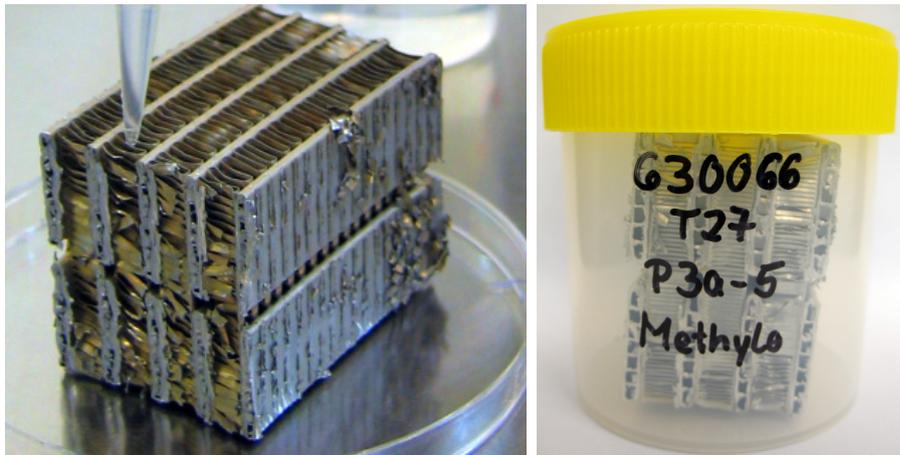
Mit dem vom bifa Umweltinstitut für die Behr GmbH & Co. KG entwickelten Verdampfer-Test wird der Einfluss von bioziden Verdampferbeschichtungen auf die Vermehrungsfähigkeit von ausgewählten Prüfkeimen ermittelt.

Für die Prüfungen werden Segmente mit einer Größe von mindestens 3 x 5 cm² Fläche und der gesamten Verdampfertiefe aus Verdampfern herausgeschnitten:



Hierzu wird zuerst ein Mittelteil des Verdampfers herausgesägt und anschließend werden aus diesem Teilstück wieder Mittelteile herausgesägt.

Für jeden Prüfkeim wird ein Prüfstück benötigt. Da die Prüfstücke durch die Sägearbeiten mit Umweltkeimen kontaminiert sind, werden sie vor der weiteren Bearbeitung über Nacht bei 120 °C exponiert, um labile Umweltkeime abzutöten. Die so vorbereiteten Prüfstücke werden in sterilen Kunststoffbechern bis zum Prüfungsstart zwischengelagert.



Teilblock aus einem Verdampfer bei der
Beimpfung

Verdampferblock
im Inkubationsgefäß

Abbildung 16: Foto eines Prüfstücks und des Inkubationsgefäßes

Für die Durchführung der eigentlichen Prüfungen wird je ein Prüfstück mit einem der ausgewählten Prüfkeime beimpft. Die zur Beimpfung verwendeten Keimsuspensionen enthalten 10^4 Pilzsporen bzw. Bakterienzellen pro Milliliter NAR-Bouillon (vergl. 2.1.2). Fünf Milliliter der jeweiligen Keimsuspension werden mit einer Mikroliterpipette in 25 μ L-Portionen gleichmäßig auf der Prüfstückoberfläche verteilt. Danach werden die Prüfstücke jeweils in ein steriles Kunststoffgefäß gesetzt und fest verschlossen. Dadurch soll eine hohe Luftfeuchtigkeit aufrecht erhalten bleiben. Die beimpften Prüfstücke werden im Brutschrank bei 25 ± 2 °C über bis zu 28 Tage bebrütet. Nach 5, 16 und 28 Tagen wird aus jedem Prüfstück jeweils eine Lamellenlage herausgeschnitten und in 20 mL steriler Natriumpyrophosphatlösung (4,7 g/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, pH 7,0) gegeben. Durch intensives Schütteln (60 min. auf dem Horizontalschüttler) werden die Keime von den Lamellenoberflächen eluiert. Die so gewonnenen Ausgangssuspensionen werden anschließend über bis zu sechs dekadische Verdünnungsstufen mit Natriumpyrophosphatlösung verdünnt und aus jeder Verdünnungsstufe werden zwei Agarschalen beimpft. Ausgewertet werden die Anzahlen an Kolonie-Bildenden Einheiten (KBE) pro mL Eluat. Anschließend wird die Trockenmasse der jeweiligen Prüfstückprobe bestimmt, damit die Lebendkeimzahl auf eine definierte Einwaage bezogen werden kann.

Da die zum Beimpfen verwendete Keimsuspension neben dem Prüfkeim die für das Wachstum notwendigen Nährstoffe enthält, ist bei der Prüfung von Verdampfersegmenten ohne biozide Beschichtung ein Wachstum der Prüfkeime und somit ein Ansteigen der Lebendkeimzahl zu erwarten. Wenn das Prüfstück eine biozide Beschichtung enthält, die den jeweiligen Prüfkeim hemmende Mengen des Wirkstoffs freisetzt, sollte ein Wachstum des Prüfkeims unterbleiben.

3.2.2 Wirksamkeit der BEHROXAL NANO®-Beschichtung im Behr-Verdampfer-Test

Für diese Prüfung wurde ein Verdampfer aus der Serienfertigung ohne biozide Ausstattung und ein Prototyp eines Verdampfers mit der neuen BEHROXAL NANO®-Beschichtung eingesetzt. Als Prüfkeime wurden sieben der 16 Keime genutzt, mit denen die Wirksamkeit von Biozidpräparaten überprüft worden ist (s. 3.1) Neben zwei in der Umwelt weitverbreiteten Schimmelpilzen (*Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum*) wurden fünf Bakterienarten ausgewählt: *Bacillus subtilis* und *Streptomyces*

griseus repräsentieren Vertreter von in der Umwelt weitverbreiteten Bakteriengattungen, die dazu befähigt sind, sehr resistente Dauerstadien (Bacillus: Endosporen; Streptomyces: Sporen) zu bilden. Das Bakterium *Pseudomonas fluorescens* wird regelmäßig in Kaltwasserströmen gefunden und wurde deshalb als wichtiger Prüfkeim ausgewählt. Die für Klimaanlagen wichtigsten Prüfkeime sind *Methylobacterium* sp. SKJH-15 und *Sphingomonas* sp. MG49.

Die mit dem Behr-Prüfsystem erzielten Ergebnisse für die sieben Prüfkeime und die beiden Verdampfer sind in Abbildung 17 zusammengefasst. Für die Prüfblöcke des Verdampfers ohne zusätzliche biozide Ausrüstung wurde durchgehend und erwartungsgemäß ein starker Zuwachs der eingesetzten Prüfkeime beobachtet. Lediglich nach 28 Tagen Kulturzeit wurden mit *Methylobacterium* und *Sphingomonas* stark reduzierte Lebendkeimzahlen festgestellt, da bei langen Kulturzeiträumen Vitalitätsverluste durch Trocknungsstress, Nahrungsmangel und/oder Anhäufung von Stoffwechselprodukten auftreten können. Die anderen Prüfkeime können dagegen resistente Dauerformen (Sporen, Endosporen) ausbilden und blieben über 28 Tage hinweg vital.

Die Prüfblöcke des BEHROXAL NANO®-beschichteten Verdampfers verhinderten das Wachstum der beiden Schimmelpilze und der fünf Bakterienarten nahezu vollständig. Lediglich bei *Bacillus* war bis zum fünften Kulturtag ein geringer Keimzuwachs festgestellt worden, der jedoch in der Folgezeit nicht weiter voranschritt. Bei 20 von 21 Proben hat die biozide Beschichtung den Keimzuwachs wirkungsvoll verhindert (biostatische bzw. „keimhemmende“ Wirkung) und bei 16 von 21 Proben lag die Keimkonzentration um mehr als Faktor zehn unter der Ausgangskeimkonzentration, sodass hier sogar eine biozide („keimabtötende“) Wirkung erzielt wurde. Die Prüfblöcke mit der BEHROXAL NANO®-Beschichtung wiesen um bis zu sechs Zehnerpotenzen geringere Keimzahlen im Vergleich zu den Prüfblöcken ohne biozide Beschichtung auf.

Der Behr-Verdampfer-Test für die Wirksamkeitsbeurteilung antimikrobieller Werkstoffbeschichtungen hat sich insgesamt als äußerst praktikabel und aussagekräftig erwiesen. Deshalb wurde der Behr-Verdampfer-Test für eine vergleichende Prüfung von zwei mit bioziden Beschichtungen ausgerüstete Verdampferprototypen der Firma Behr und fünf Verdampfertypen mit biozider Ausrüstung anderer Hersteller verwendet (3.2.3).

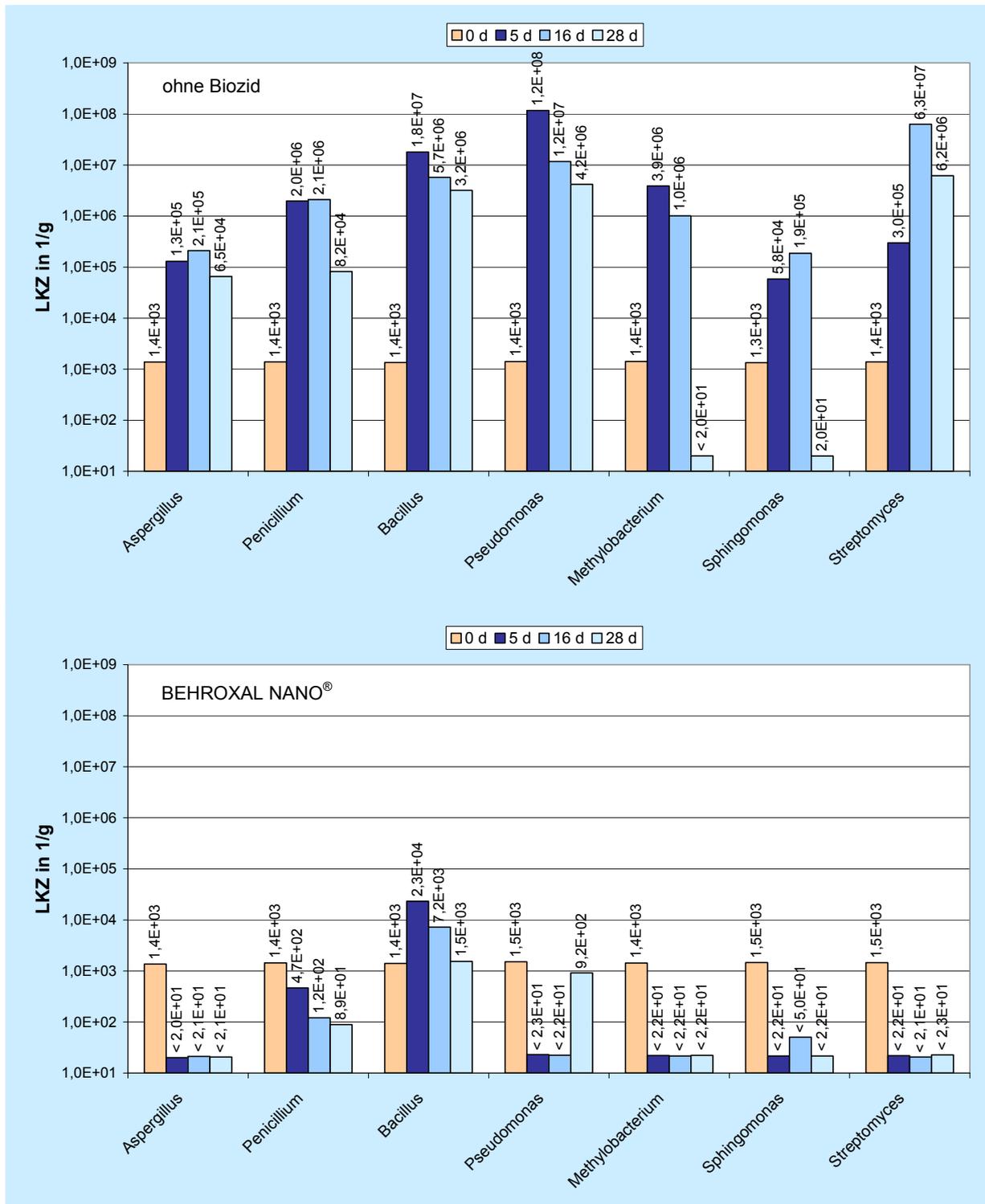


Abbildung 17: Lebendkeimzahlen von Verdampfer-Prüfblöcken nach Beimpfung mit verschiedenen Pilz- und Bakterienarten

Anmerkung: Die bei Methylobacterium und Sporingomonas nach 28 Tagen beobachteten Vitalitätsverluste traten auch ohne Biozideinfluss auf und können die Folge von Trocknungsstress, Nahrungsmangel und/oder Anhäufung von Stoffwechselprodukten sein.

3.2.3 Vergleich verschiedener Biozid-beschichteter Verdampfer

Mit dem Behr-Verdampfer-Test wurde eine vergleichende Untersuchung der Wirksamkeit von Biozid-beschichtungen von sieben Verdampfertypen durchgeführt: Neben zwei Prototypverdampfern der Firma Behr wurden fünf Verdampfer unterschiedlicher Hersteller über den Ersatzteilhandel beschafft und untersucht. Sämtliche Verdampfer wurden vorher von der Firma Behr bei Leistungsmessungen eingesetzt und damit konditioniert: Die dabei in großen Volumina anfallenden Kondensate haben leicht auswaschbare Biozidanteile entfernt und sollten praxisnahe Bedingungen beim Betrieb der Verdampfer in Pkw-Klimaanlagen schaffen.

Die Prüfungen wurden auf jene beiden Testkeime (Methylobacterium sp. SKJH 15, Sphingomonas sp. MG49) beschränkt, die in Pkw-Klimaanlagen besonders häufig vorkommen und aus ihnen isoliert worden sind. Nach der Beimpfung der Verdampfermaterialien mit $1,4 \times 10^3$ bis $2,7 \times 10^3$ Bakterien pro Gramm wurden die Verdampfer-Prüfblöcke bei 25 °C bebrütet. Nach 5, 16 und 28 Tagen wurden Teilproben der Prüfblöcke entnommen und die Lebendkeimzahl auf den Prüfmaterialien bestimmt. Dabei waren drei Ergebnisvarianten denkbar:

- **Ergebnisvariante A:** Wenn die Beschichtungen sehr rasch ihre biozide Wirkung entwickeln und das Wirkspektrum der Biozide die eingesetzten Prüfkeime beinhaltet, ist eine rasche Inaktivierung der Prüfkeime zu erwarten. In diesem Fall lägen die Lebendkeimzahlfunde unter den oben genannten Ausgangswerten. **Derartige Beschichtungen sind optimal, da sie die Ausbildung von Biofilmen auf den Oberflächen wirkungsvoll verhindern.**
- **Ergebnisvariante B:** Wenn die Biozide zwar grundsätzlich wirksam sind, die Wirkstoffe aber erst verzögert freigesetzt werden, wäre zunächst ein Wachstum der Prüfkeime zu erwarten, bis sich eine hemmende Konzentration des Wirkstoffes einstellt. Danach sollte die Vitalität der Prüfkeime stark abnehmen und im Optimalfall zur vollständigen Inaktivierung der Prüfkeime führen. **Derartige Beschichtungen lassen zwar die vorübergehende Ausbildung von Biofilmen zu, können deren biologische Aktivität jedoch mit der Zeit einschränken.** (Obwohl im Behr-Verdampfer-Test auch mehrwöchige Einwirkzeiten geprüft werden, sind entsprechend lange Stillstandszeiten bei Pkw-Klimaanlagen in der Praxis selten.)
- **Ergebnisvariante C:** Wenn das Wirkspektrum des Biozids die eingesetzten Prüfkeime nicht abdeckt und/oder wenn die Biozidfreisetzung unzureichend ist, wären ein Wachstum der Prüfkeime und eine im Prüfzeitraum unveränderte Vitalität der Prüfkeime zu erwarten. **Derartige Beschichtungen wären als wirkungslos erkannt.**

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 und Abbildung 18 zusammengefasst.

Tabelle 6: Matrix der beobachteten Ergebnisvarianten

Prüfkeim	BEHROXAL NANO®	BEHR "JAPAN"	Produkt 1	Produkt 2	Produkt 3	Produkt 4	Produkt 5
Methylobacterium	A	B	B	C	C	B	C
Sphingomonas	A	A	A	C	C	A	B

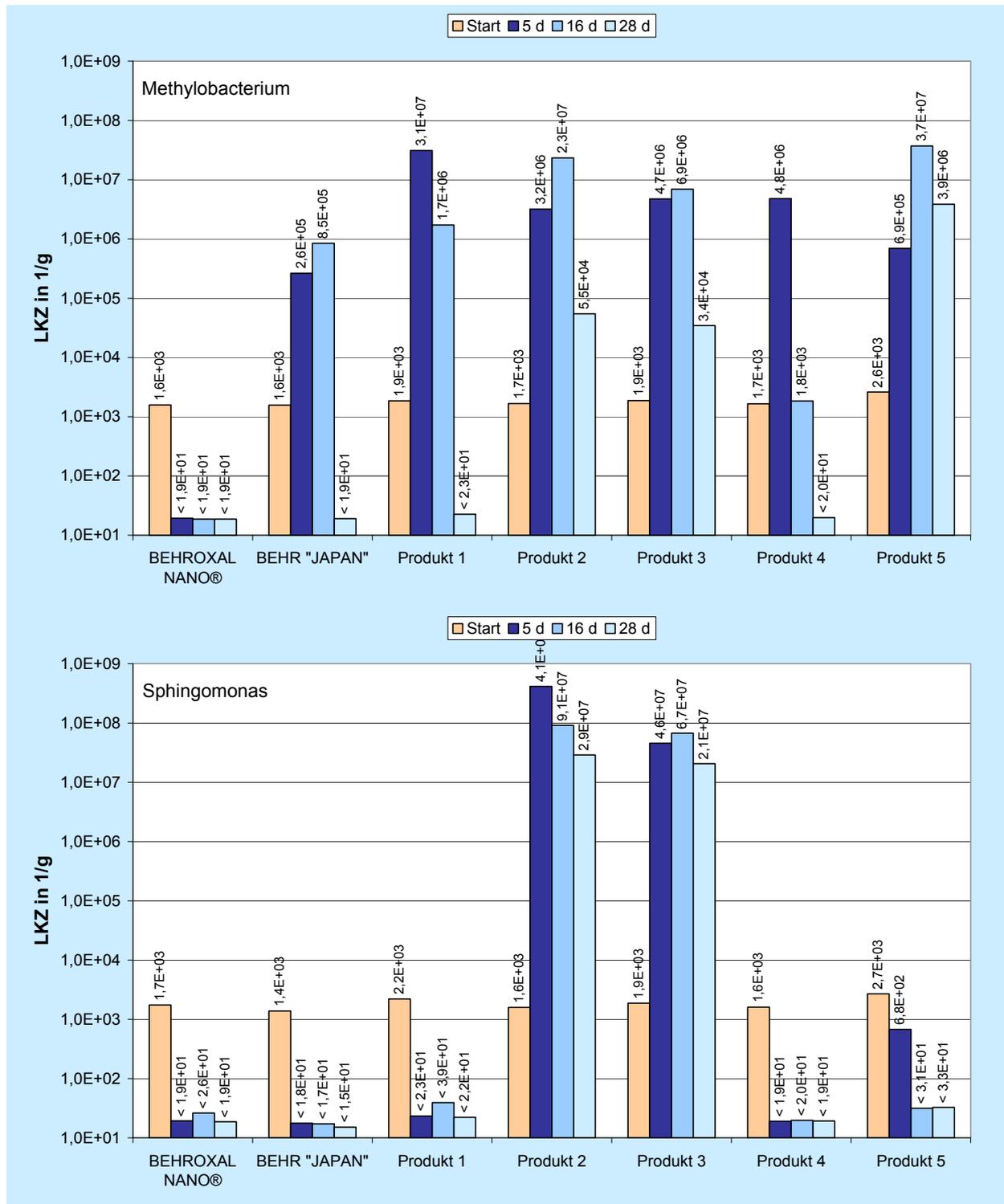


Abbildung 18: Ergebnisse im Behr-Verdampfer-Test mit 7 Verdampfertypen von 6 Herstellern

BEHR „JAPAN“: Prototyp einer Beschichtung mit einem japanischen Biozidwirkstoff

Anmerkung: Die bei Methylobacterium und Sphingomonas nach 28 Tagen beobachteten Vitalitätsverluste traten auch ohne Biozideinfluss auf und können die Folge von Trocknungsstress, Nahrungsmangel und/oder Anhäufung von Stoffwechselprodukten sein.

Nur mit der Beschichtung BEHROXAL NANO® wurde sowohl mit dem Prüfkeim *Methylobacterium* als auch mit dem Prüfkeim *Sphingomonas* die als optimal einzustufende Ergebnisvariante A erhalten. Die Ergebnisvariante A wurde ansonsten von keiner anderen Beschichtung mit dem Prüfkeim *Methylobacterium* erreicht, da das Wachstum dieses Prüfkeims offenbar deutlich schwerer zu hemmen ist als das des Prüfkeims *Sphingomonas*.

Drei Beschichtungen (BEHR „JAPAN“; Produkte 1 und 4) erreichten zumindest mit *Methylobacterium* die Ergebnisvariante B und mit *Sphingomonas* die Ergebnisvariante A.

Der Verdampfer des Produktes 5 erreichte zwar mit *Sphingomonas* die Ergebnisvariante B, doch wurde mit *Methylobacterium* nur die Ergebnisvariante C erreicht. Mit den Produkten 2 und 3 wurde sogar für beide Prüfkeime nur die Ergebnisvariante C erreicht, sodass diese Produkte gegenüber Keimen aus Pkw-Klimaanlagen wirkungslos sind.

Insgesamt hat sich der Behr-Verdampfer-Test als praktikabel und aussagekräftig erwiesen, da mit ihm eine aussagekräftige Differenzierung von wirksamen und wirkungslosen Beschichtungen möglich ist.

4 Fazit

Mit einer Kombination von umweltmikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungsmethoden ist es in der Regel relativ schnell möglich, in technischen Einrichtungen das Vorhandensein von zumeist unerwünschten Biofilmen zu überprüfen (s. 2.1.1).

Das Beispiel der Untersuchungen von Pkw-Klimaanlagen bestätigt diese Aussage: Durch eine Kombination von mikroskopischen Untersuchungen und Lebendkeimzahlbestimmungen konnte gezeigt werden, dass in Pkw-Klimaanlagen weltweit vor allem in der Umwelt häufig vorhandene Bakterien der Gattungen *Methylobacterium* und *Sphingomonas* vorkommen (s. 2.1.2). Die Kenntnis der Identität der am Standort vorhandenen Keime ist die Basis für die Beurteilung des hygienischen Risikopotenzials. Außerdem ermöglicht die Kenntnis der systematischen Zuordnung begründete Annahmen zu den Wachstumsansprüchen der vorgefundenen Keime. Im vorliegenden Fall konnte geklärt werden, dass die in Pkw-Klimaanlagen vorkommenden Bakterien sich von flüchtigen organischen Verbindungen (VOC) ernähren können (s. 2.2).

Die Isolation der in Pkw-Klimaanlagen vorkommenden Keime bot zudem die Möglichkeit, diese als Testorganismen für die Auswahl von geeigneten bioziden Wirkstoffen einzusetzen (s. 3.1). Erst der Einsatz eines hinreichend wirksamen Biozids ermöglicht zielgerichtete Arbeiten zur Entwicklung einer Beschichtung mit biozider Wirkung auf Pkw-Klimaanlagenkeime. In einem speziell für die Prüfung von Biozid-ausgerüsteten Beschichtungen von Verdampfern entwickelten Testverfahren zeigte sich, dass die neu entwickelte Beschichtung BEHROXAL NANO® das Wachstum der in Pkw-Klimaanlagen vorkommenden Keime wirkungsvoller unterdrückt als andere, derzeit am Markt vorhandene Verdampfer-typen (s. 3.2.2 und 3.2.3).

5 Literatur

- Anesti, V.; McDonald, I.R.; Ramaswamy, M.; Wade, W.G.; Kelly, D.P.; Wood, A.P. (2005): Isolation and molecular detection of methylotrophic bacteria occurring in the human mouth. *Environmental Microbiology*, 7, 8, 1227-1238
- Anesti, V.; Vohra, J.; Goonetilleka, S.; McDonald, I.R.; Sträubler, B.; Stackebrandt, E.; Kelly, D.P.; Wood, A.P. (2004): Molecular detection and isolation of facultatively methylotrophic bacteria, including *Methylobacterium podarium* sp. nov., from the human foot microflora. *Environmental Microbiology*, 6, 8, 820-830
- BMBF (Hrsg.) (1998): Emissionen im Kraftfahrzeuginnenraum – Fünf Jahre Forschungsförderung. Redaktion: Bartel, W.; Wien-ecke, P.; Frankfurt am Main, April 1998
- Brunner, W.; Staub, D.; Leisinger, T. (1980): Bacterial Degradation of Dichloromethane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 5, 950-958
- Davis, K.E.R.; Joseph, S.J.; Janssen, P.H. (2005): Effects of Growth Medium, Inoculum Size, and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 2, 826-834
- DIN 1946-3 (2006): Raumlufttechnik – Teil 3: Klimatisierung von Personenkraftwagen und Lastkraftwagen. Juli 2006
- Fleming, H.G.; Wingender, J. (2001): Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *BIUZ*, 31, 3, 169-180
- Gremmer, L.; Svetlitchnyi, V.; Meyer, O.; Dobbek, H.; Huber, R. (2001): Das Leben mit Kohlenmonoxid: Biologische Katalyse an außergewöhnlichen Heterometallzentren. *BIOspektrum*, 7, 5, 415-420
- Han, X.Y. (2007): Bacterial Identification Based on 16S Ribosomal RNA Gene Sequence Analysis. In: Tang, Y.-W.; Stratton, C. W.: *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, Springer-Verlag, 323-332
- Heinlein, J. (1994): Erforschung und Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Reinigung schwach belasteter, großvolumiger Abluftströme bei Straßentunneln und zur Nutzung in Anlagen – Phase I -. Abschlussbericht für den Zeitraum vom 01.07.1991 bis 30.09.1994, KF: 01 VQ 90404; Zentrum für Energie-, Wasser- und Umwelttechnik, Hamburg
- Hiraishi, A.; Furuhashi, K.; Matsumoto, A.; Koike, K.A.; Fukuyama, M.; Tabuchi, K. (1995): Phenotypic and Genetic Diversity of Chlorine-Resistant *Methylobacterium* Strains Isolated from Various Environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 6, 2099-2107
- Hugenholz, P.; Cunningham, M.A.; Hendrikz, J.K.; Fuerst, J.A. (1995): Desiccation resistance of bacteria isolated from an air-handling system biofilm determined using a simple quantitative membrane filter method. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 1, 41-46
- Jörg, R.; Hoppenheidt, K.; Neef, A.; Kämpfer, P. (1997): Methoden der Sammlung und Identifizierung luftgetragener Mikroorganismen und Endotoxine. In: Kämpfer, P.; Weißenfels, W.D. (Hrsg.): *Luftgetragene Mikroorganismen in Abfallbehandlungsanlagen*. VAAM, Fachgruppe Umweltmikrobiologie, 43-102
- Joseph, S.J.; Hugenholz, P.; Sangwan, P.; Osborne, C.A.; Janssen, P.H. (2003): Laboratory Cultivation of Widespread and Previously Uncultured Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 12, 7210-7215
- Kelley, S.T.; Tneissen, U.; Angenent, L.T. (2004): Molecular Analysis of Shower Curtain Biofilm Microbes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 7, 4187-4192
- La Duc, M.T.; Dekas, A.; Osman, S.; Moissl, C.; Newcombe, D.; Venkateswaran, K. (2007): Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Tolerating the Extreme Conditions of Clean Room Environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 8, 2600-2611
- LfU – Bayerisches Landesamt für Umweltschutz (2003): Information über Abgase des Kraftfahrzeugverkehrs
- Lipski, A.; Klatte, S.; Bendinger, B.; Altendorf, K.H. (1992): Differentiation of Gram-Negative, Nonfermentative Bacteria Isolated from Biofilters on the Basis of Fatty Acid Composition, Quinone System, and Physiological Reaction Profiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 6, 2053-2065
- Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1994) Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 15, 2-3, 155-173
- Müller, A. (2008): Verwertbarkeit von flüchtigen Verbindungen durch Bakterien aus Pkw-Klimaanlagen. Diplomarbeit, Fakultät für Biotechnologie und Bioinformatik, FH Weihenstephan
- Rose, L.J.; Simmons, R.B.; Crow, S. A. (2000): Volatile Organic Compounds Associated with Microbial Growth in Automobile Air Conditioning Systems. *Current Microbiology*, 41, 206-209
- Schleifer, K.H. (2002): Bedeutung der Mikroorganismen für die Umwelt. In: Bayerische Akademie der Wissenschaften (Hrsg.): *Rundgespräche der Kommission für Ökologie – Bedeutung der Mikroorganismen für die Umwelt*. Heft, 23, 13-16

- Schleifer, K.H. (2004): Microbial Diversity: Facts, Problems and Prospects. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 1, 3-9
- Simmons, R.B.; Noble, J.A.; Rose, L.; Price, D.L.; Crow, S.A.; Ahearn, D.G. (1997): Fungal colonization of automobile air conditioning systems. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19, 150-153
- Simmons, R.B.; Rose, L.J.; Crow, S.A.; Ahearn, D.G. (1999): The Occurrence and Persistence of Mixed Biofilms in Automobile Air Conditioning Systems. *Current Microbiology*, 39, 141-145
- Simões, L.C. ; Simões, M. ; Vieira, M.J. (2007): Biofilm Interactions between Distinct Bacterial Genera Isolated from Drinking Water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 19, 6192-200
- Singh, R.; Stine, O.C.; Smith, D.L.; Spitznagel, J.K.; Labib, M.E.; Williams, H.N. (2003): Microbial Diversity of Biofilms in Dental Unit Water Systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 6, 3412-3420
- Timke, M.; Wang-Lieu, N.Q.; Altendorf, K.; Lipski, A. (2005): Community Structure and Diversity of Biofilms from a Beer Bottling Plant as Revealed Using 16S rRNA Gene Clone Libraries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 10, 6446-6452
- Universität Hamburg (Hrsg.) (1994): Erforschung und Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Reinigung schwach belasteter, großvolumiger Abluftströme bei Straßentunneln und zur Nutzung in Anlagen. Abschlussbericht für den Zeitraum vom 01.07.1991 bis 30.09.1994
- van Loosdrecht, M.C.; Lyklema, J.; Norde, W.; Zehnder, A.J. (1990): Influence of Interfaces on Microbial Activity. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 54, 1, 75-87
- Watnick, P.; Kolter, R. (2000): Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, 182, 10, 2675-2679
- Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. (1991): 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, 173, 2, 697-703
- Whitman, W.B.; Coleman, D.C.; Wiebe, W.J. (1998): Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 12, 6578-6583
- Wiedmann, T.; Kersten, J.; Ballschmiter, K. (2000): Art und Menge von stofflichen Emissionen aus dem Verkehrsbereich. Arbeitsbericht 146 der Akademie für Technikfolgenabschätzung in Baden-Württemberg. <http://elib.uni-stuttgart.de/opus/volltexte/2004/1702/>
- Woo, P.C.; Lau, S.K.; Teng, J.L.; Tse, H.; Yuen, K.Y. (2008): Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*; 14, 10, 908-934
- Woolhouse, M.E.J.; Gowtage-Sequeria, S. (2005): Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. *Emerg Infect Dis*, 11, 12, 1842-1847
- Yoshida, T.; Matsunaga, I.; Tomioka, K.; Kumagai, S. (2006a): Interior Air Pollution in Automotive Cabins by Volatile Organic Compounds Diffusing from Interior Materials: I. Survey of 101 Types of Japanese Domestically Produced Cars for Private Use. *Indoor and Built Environment*, 15, 6, 425-444
- Yoshida, T.; Matsunaga, I.; Tomioka, K.; Kumagai, S. (2006b): Interior Air Pollution in Automotive Cabins by Volatile Organic Compounds Diffusing from Interior Materials: II. Influence of Manufacturer, Specifications and Usage Status on Air Pollution, and Estimation of Air Pollution Levels in Initial Phases of Delivery as a New Car. *Indoor and Built Environment*, 15, 6, 445-462
- Zengler, K. (ed.) (2008): Accessing uncultivated microorganisms - From the environment to organisms and genomes and back. ASM Press, Washington, ISBN: 9781555814069

bifa Umweltinstitut GmbH

Am Mittleren Moos 46

86167 Augsburg

Tel. +49 821 7000-0

Fax. +49 821 7000-100

www.bifa.de