

Hochschule Niederrhein Krefeld

Fachbereich 01 Chemie

**Studiengang
„Chemie und Biotechnologie“**

Ermittlung des Dekontaminierungserfolg von *Aspergillus versicolor* durch antimikrobiell wirkende Substanzen

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Bachelor of Science

vorgelegt von

Martina Graßl

Matrikelnr.: 716270

Sommersemester 2011/12

Betreuer: Prof. Dr.–Ing. Anna Nickisch–Hartfiel

Korreferent: Prof. Dr.–Ing. Michael Lindemann

**Die vorliegende Arbeit wurde in Düsseldorf im
Labor der Urbanus GmbH
Angefertigt**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Abschlussarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und die benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen deutlich als solche gekennzeichnet habe.

Diese Abschlussarbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland als Prüfungsarbeit vorgelegt.

Duisburg, den

Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Frau Judith Müller dafür bedanken, dass sie mir die Räumlichkeiten von Labor Urbanus GmbH zur Verfügung gestellt hat und mich im Rahmen meiner Abschlussarbeit dieses interessante Thema hat bearbeiten lassen, sowie für die Unterstützung meiner Arbeit und ihre zahlreichen, wertvollen Ratschläge.

Besonders möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Labors Urbanus bedanken die mich von der ersten Minute an freundlich empfangen haben und sich zu jeder Zeit hilfsbereit und äußerst zuvorkommend zeigten.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle Silvia Noack hervorheben. Sie stand mir während der gesamten Praktikumszeit mit Rat und Tat zur Seite und wies mich in die schwierige, analytische Auswertung am Mikroskop ein. Es ist ihrer Fachkompetenz zu verdanken, dass ich die nötigen Arbeitsschritte schnell erlernen konnte und die Arbeit so zu einem gelungenen Abschluss bringen konnte.

Ich möchte mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben haben zu studieren.

Zum Schluss danke ich noch Bernadette Thiede und Sabrina Wittersheim für die gewissenhafte Korrekturlesung meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Abbildngsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	XI
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
2 Fragestellung	5
3 Grundlagen	7
3.1 Schimmelpilze	7
3.1.1 Schimmelpilz Wachstum in Gebäuden und Innenräumen	8
3.1.2 Feuchtigkeit	9
3.1.3 Substrat	9
3.1.4 pH-Wert	10
3.2 Aspergillus versicolor.....	11
3.3 Analysemethoden zum Auffinden des Befalls	11
3.4 Bewertungskriterien nach Labor Urbanus GmbH.....	12
3.5 Sanierungsmaßnahmen	13
3.6 Desinfektionsmittel.....	14
3.6.1 Einwirkzeit, Konzentration und Wirkspektrum	15
3.6.2 pH-Wert	15
3.6.3 Temperatur	15
3.6.4 Feuchtigkeit und Verteilungskoeffizient	16
3.7 Ausgewählte mikrobizide Stoffgruppen.....	16
3.7.1 Alkohole	16
3.7.2 Carbonsäuren	16
3.7.3 Chlorspalter	17
3.7.4 Wasserstoffperoxid.....	17
4 Material und Methoden	19
4.1 Geräte, Material, Chemikalien & Mikroorganismus	19
4.2 Ermittlung der optimalen Beimpfungsmethode der Tapete zur Herstellung homogenen Probenmaterials	20
4.3 Versuchsdurchführung	21
4.3.1 Ermittlung der Gesamtzellzahl nach Färbung mit Acridine Orange (AO).....	23

4.3.2	Ermittlung der biochemischen Aktivität nach Färbung mit Fluoresceindiacetate (FDA).....	24
5	Resultate	26
5.1	Herstellung Homogenes Probenmaterial	26
5.2	Gesamtzellzahl/cm ²	27
5.3	Biochemische Aktivität/cm ²	32
5.4	Koloniebildende Einheiten/cm ²	37
5.5	Gegenüberstellung der GZ/cm ² , BA/cm ² und KBE/cm ² Werte der Referenzsubstanz und der antimikrobiell wirkenden Substanzen	42
6	Diskussion	47
6.1	Zusammenfassung der ermittelten Ergebnisse	55
7	Ausblick	57
8	Literaturverzeichnis	59

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1 ABLAUF DER BEIMPFE V2-METHODE: 1: 1 ML DER ASP. VERSICOLOR SUSPENSION WIRD IN EINE LEERE SAUBERE PETRISCHALE GEGEBEN 2: DAS 2*2 CM GROÖE TAPETENSTÜCKEN WIRD MIT DER OBERSEITE EINGETAUCHT UND VOLLSTÄNDIG BENETZT 3: DAS TAPETENSTÜCK WIRD MIT DER UNBENETZTEN SEITE AUF DEN DG 18 AGAR GELEGT	22
ABB. 2 TAPETENSTÜCKE NACH 10 TÄGIGER INKUBATION; DAS ÜBERWUCHERTE TAPETENSTÜCKCHEN WURDE MIT EINEM SKALPELL AUS DEM DG18 AGAR AUSGESCHNITTEN UND IN EINE VORBESCHRIFTETE PETRISCHALE ZUR WEITEREN BEHANDLUNG GELEGT.....	22
ABB. 3 MITTELWERTE DER GESAMTZELLZAHL/CM ² ASPERGILLUS VERSICOLOR DER AUS DER REINKULTUR; DIFFERENZ DER GESAMTZELLZAHL \approx 42%; GZ DER STARTKULTUR $\approx 1,8 \cdot 10^9$	26
ABB. 4 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER GESAMTZELLZAHL/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O, IPA, JATI, CERESIT UND H ₂ O ₂ ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	27
ABB. 5 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER GESAMTZELLZAHL VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST.H ₂ O UND IPA, ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN	28
ABB. 6 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER GESAMTZELLZAHL/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O UND JATI-SCHIMMELN ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN	29
ABB. 7 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER GESAMTZELLZAHL/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O UND CERESIT-ANTI-SCHIMMEL ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	30
ABB. 8 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER GESAMTZELLZAHL/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O UND H ₂ O ₂ (12%) ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	31
ABB. 9 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER BIOCHEMISCHEN AKTIVITÄTEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O, IPA (70%), JATI-SCHIMMELN ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	32
ABB. 10 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER BIOCHEMISCHEN AKTIVITÄTEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O UND IPA ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN....	33

ABB. 11 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER BIOCHEMISCHEN AKTIVITÄTEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O UND JATI-SCHIMMELENTFERNER ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN	34
ABB. 12 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER BIOCHEMISCHEN AKTIVITÄTEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O UND CERESIT-ANTI-SCHIMMEL ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	35
ABB. 13 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER BIOCHEMISCHEN AKTIVITÄTEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O UND H ₂ O ₂ (12%) ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	36
ABB. 14 GEGENÜBERSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER KOLONIEBILDENDEN EINHEITEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O, IPA (70%), JATI-SCHIMMELENTFERNER, CERESIT-ANTI-SCHIMMEL UND H ₂ O ₂ (12%) ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	37
ABB. 15 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER KOLONIEBILDENDEN EINHEITEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O UND IPA (70%) ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	38
ABB. 16 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER KOLONIEBILDENDEN EINHEITEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O UND JATI-SCHIMMELENTFERNER ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	39
ABB. 17 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER KOLONIEBILDENDEN EINHEITEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O UND CERESIT-ANTI-SCHIMMEL ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	40
ABB. 18 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER MITTELWERTE DER KOLONIEBILDENDEN EINHEITEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR DEST. H ₂ O UND H ₂ O ₂ (12%) ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	41
ABB.19 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER DEST H ₂ O MITTELWERTE DER GESAMTZELLZAHL/CM ² , BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT/CM ² UND DER KOLONIEBILDENDEN EINHEITEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	42
ABB.20 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER IPA (70%) MITTELWERTE DER GESAMTZELLZAHL/CM ² , BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT/CM ² UND DER KOLONIEBILDENDEN EINHEITEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN.....	43
ABB.21 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER JATI-SCHIMMELENTFERNER MITTELWERTE DER GESAMTZELLZAHL/CM ² , BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT/CM ² UND DER KOLONIEBILDENDEN EINHEITEN/CM ² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR ÜBER DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN	44

- ABB. 22 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER CERESIT-ANTI-SCHIMMEL
MITTELWERTE DER GESAMTZELLZAHL/CM², BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT/CM² UND
DER KOLONIEBILDENDEN EINHEITEN/CM² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR ÜBER
DEN GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN 45
- ABB.23 LOGARITHMISCHE DARSTELLUNG ALLER H₂O₂ MITTELWERTE DER
GESAMTZELLZAHL/CM², BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT/CM² UND DER
KOLONIEBILDENDEN EINHEITEN/CM² VON ASPERGILLUS VERSICOLOR ÜBER DEN
GESAMTEN ZEITRAUM DES VERSUCHS NACH DEN INKUBATIONSZEITEN..... 46

Tabellenverzeichnis

TAB. 1 BEURTEILUNG DER ERGEBNISSE EINER ERWEITERTEN MIKROBIOLOGISCHEN MATERIAL-UNTERSUCHUNG VON LABOR URBANUS GMBH, DÜSSELDORF; SCHIMMELPILZE, GEKÜRZT [8].....	12
TAB. 2 BEURTEILUNG DER GZ, KBE & BA NACH LABOR URBANUS GMBH [8]	13
TAB. 3 MITTELWERTE DER GESAMTZELLZAHL/CM ² NACH METHODE V1 UND V2 UND DEREN STANDARTABWEICHUNG (N=5).....	26
TAB. 4 GZ/CM ² GESAMTGEGÜBERSTELLUNG ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8).....	27
TAB. 5 GZ/CM ² DEST. H ₂ O/IPA (70%) ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8)	28
TAB. 6 GZ/CM ² DEST. H ₂ O/JATI-SCHIMMELENTFERNER ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8).....	29
TAB. 7 GZ/CM ² DEST. H ₂ O/CERESIT-ANTI-SCHIMMEL ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8).....	30
TAB. 8 GZ DEST. H ₂ O/H ₂ O ₂ (12%)ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8)	31
TAB. 9 BA GESAMT GEGENÜBERSTELLUNG ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8).....	32
TAB. 10 BA/CM ² DEST. H ₂ O/IPA (70%) ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8)	33
TAB. 11 BA/CM ² DEST. H ₂ O/JATI-SCHIMMELENTFERNER ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8).....	34
TAB. 12 BA/CM ² DEST. H ₂ O/CERESIT-ANTI-SCHIMMEL ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8).....	35
TAB. 13 BA/CM ² DEST. H ₂ O/H ₂ O ₂ (12%) ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8)	36
TAB. 14 KBE/CM ² GESAMT GEGENÜBERSTELLUNG ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8).....	37
TAB. 15 KBE/CM ² DEST. H ₂ O/IPA (70%) ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8)	38
TAB. 16 KBE/CM ² DEST. H ₂ O/JATI-SCHIMMELENTFERNER ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8).....	39
TAB. 17 KBE/CM ² DEST. H ₂ O/CERESIT-ANTI-SCHIMMEL ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8).....	40
TAB. 18 KBE/CM ² DEST. H ₂ O/H ₂ O ₂ ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG (N=8).....	41
TAB. 19 DEST. H ₂ O ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG DER GZ/CM ² , BA/CM ² UND KBE/CM ² (N=8)	42
TAB. 20 IPA (70%) ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG DER GZ/CM ² , BA/CM ² UND KBE/CM ² (N=8)	43
TAB.21 JATI-SCHIMMELENTFERNER ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG DER GZ/CM ² , BA/CM ² UND KBE/CM ² (N=8)	44

TAB.22 CERESIT–ANTI–SCHIMMEL ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG DER GZ/CM ² , BA/CM ² UND KBE/CM ² (N=8)	45
TAB. 23 H ₂ O ₂ (12%) ERGEBNISSE UND STANDARTABWEICHUNG DER GZ/CM ² , BA/CM ² UND KBE/CM ² (N=8)	46
TAB. 24 ZUSAMMENFASSUNG ALLER MESSERGEBNISSE: STARTKULTUR ENTHIELT 9,9*10 ⁸ ZELLEN/CM ²	55
TAB. 25 TABELLARISCHE ÜBERSICHT ÜBER GZ/CM ² , BA/CM ² UND KBE/CM ² ÜBER DEN ZEITRAUM DES VERSUCHS	56

Abkürzungsverzeichnis

a_w	Wasseraktivität
Asp.	Aspergillus
BA	Biochemische Aktivität
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Zirka
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
d	Tage
dest.	Destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DG 18	Dichloran–Glycerol–Agar
FDA	Fluorescin Diacetat
g	Gramm
GZ	Gesamtzellzahl
h	Stunden
HClO	Hypochlorige Säure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IPA	Isopropanol
KBE	Koloniebildende Einheit
l	Liter
log.	Logarithmisch
M	Monat
m ²	Quadratmeter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MVOC	Micobial volatile organic compounds
NaOCl	Natriumhypochlorid
RNA	Ribonukleinsäure
s.g.	So genannte
u.a.	Unter anderem
vgl.	Vergleich
z.B.	Zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent
µl	Mikroliter

Zusammenfassung

Durch die zunehmende Aufklärung über Schimmelpilze und deren gesundheitsschädlichen Eigenschaften auf den Menschen, ist deren fachgerechte Entfernung (Sanierung) aus Wohnräumen in den letzten Jahren zu einem bedeutsamen Thema geworden.

Zu einer fachgerechten Sanierung gehören laut Umweltbundesamt neben der Entfernung der Ursachen, die zu dem Schimmelpilzbefall führten, auch die Reinigung der befallenen Materialien (falls dies möglich ist) und die abschließende Feinreinigung der ganzen Wohnung, um die vorhandenen Schimmelpilzsporen zu beseitigen. Aus Kostengründen wird oft darauf verzichtet, die Ursachen für den Schimmelpilzbefall zu beseitigen, stattdessen werden die befallenen Stellen oberflächlich durch besprühen mit Desinfektionsmitteln behandelt und eine Feinreinigung der Wohnung bleibt aus. Meist sind bereits nach wenigen Monaten die selben und/oder andere Stellen wieder befallen.

Laut Umweltbundesamt sind viele Desinfektionsverfahren in der Praxis unwirksam. Die als wirksam getesteten Desinfektionsmittel beziehen sich in ihrer Bewertung oft nur auf die Auswertung der Keimzahlbestimmung. Bei der Schadensbewertung von Schimmelpilzschäden oder Erfolgskontrollen nach einer Sanierungsmaßnahme ist die Keimzahlbestimmung als Bewertungskriterium für einen Schimmelpilzschaden nicht zwingend geeignet. Vielen Schimmelpilzen die auf Baumaterialien gewachsen sind, geht wegen ihrer Adaption an das Material die Fähigkeit verloren unter Laborbedingungen wieder auf Nährböden anzuwachsen.

Da der ausschlaggebende Punkt für einen Schimmelpilzbefall, die Verfügbarkeit von Wasser ist, wird in diesem Versuch ein abgetrockneter, mit Desinfektionsmittel behandelter Schimmelpilzbefall auf einer handelsüblichen Rauhfasertapete simuliert. Auf ihre Wirksamkeit getestet wurden 70%-iges Isopropanol, Jati-Schimmelentferner (Hauptwirkstoff Wasserstoffperoxid mit

Fruchtsäureanteil), Ceresti–Anti–Schimmel (Hauptwirkstoff Natriumhypochlorid) und 12%–iges Wasserstoffperoxid. Die Proben wurden bezüglich ihrer Biomassenproduktion (GZ/cm²), ihrer biochemischen Aktivität (BA/cm²) und der Keimzahl (KBE/cm²) nach 2 Stunden, 24 Stunden, 6 Tagen und einem Monat begutachtet.

Die Ergebnisse zeigen, dass nach insgesamt einem Monat Inkubationszeit keines der Desinfektionsmittel den Biomassenzuwachs reduzieren konnte, mit Ausnahme des Ceresit–Anti–Schimmel waren alle Proben biochemisch aktiv während die Keimzahl aller Proben nach einem Monat im Normalbereich lag und nach den Bewertungskriterien der Labor Urbanus GmbH als nicht belastet bewertet werden würde.

1 Einleitung

Das Wachstum von Schimmelpilzen in Innenräumen und Gebäuden ist kein Problem der Neuzeit. Mit zunehmender Erkenntnis über Mycotoxine, Microbial volatile organic compounds (MVOC) oder des allergieauslösenden Potentials von Schimmelpilzen fand das Thema immer größere Beachtung in der Gesellschaft. Neben dem ästhetischen und hygienischen Problem treten auch Schäden an der Bausubstanz auf. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass neben dem Schimmelbefall die Belastung durch Bakterien und andere Mikroorganismen und Kleinstlebewesen einhergehen. Einem Befall können verschiedene Ursachen (u.a. bauliche Mängel an der Fassade, falsches Nutzerverhalten, Wasserschaden) zu Grunde liegen.

Bis heute gibt es keine gesetzlich verbindlichen Grenz- oder Richtwerte für die Konzentration der Exposition von Schimmelpilzen im Innenraum. Obwohl es längst Richtwerte für den Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen gibt (zum Beispiel in Kläranlagen), finden sie im Innenraum erst Anwendung, wenn eine Sanierung vorgenommen wird. Arbeiter müssen gemäß der Biostoffverordnung vor dem schädlichen Einfluss der Schimmelpilze geschützt werden. Betroffene Bewohner sind dem Befall kontinuierlich ausgesetzt.

Vorbeugung und Beseitigung der Schäden verursachen erhebliche Kosten. Je nach Ausmaß des Schadens können so horrend Summen zusammenkommen. Immer häufiger bieten Sanierungsfirmen chemische Mittel, die meist durch eine Sprühmethodik oberflächlich aufgebracht werden als preiswertere Variante der baulichen Sanierungsmaßnahme an. Der Befall scheint so schnell beseitigt worden zu sein. Allerdings sind oft dieselben und neue Stellen nach kürzester Zeit „wieder“ befallen und die Kosten zur Beseitigung müssen erneut getragen werden.

Untersuchungen bezüglich der Wirksamkeit der chemischen Mittel zeigen, dass die Anzahl der Mikroorganismen unter Laborbedingungen tatsächlich reduziert werden kann, bewertet wird hier meist nur die Keimzahl. Jedoch ist die

Reduzierung der Keimzahl nur kurzfristig, da sich die Mikroorganismen nicht nur auf der Oberfläche befinden, sondern auch tiefer in das Material eindringen können. Die Untersuchungen bewerten auch nicht die Konzentration der Biomasse. Darin enthalten sind lebende wie tote Zellen. Solange es lebende Zellen gibt, kann es unter günstigen Bedingungen zum erneuten Befall kommen.

2 Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der These, dass antimikrobiell wirkende Substanzen eine reduzierende Wirkung auf das Schimmelpilzwachstum auf Baumaterialien im Innenraum (hier handelsübliche Tapete) haben, insbesondere auf die Biomasse (GZ/cm², Gesamtzellzahl), die biochemische Aktivität (BA/cm²) und auf die koloniebildende Einheiten (KBE/cm²). Es werden Desinfektionsmittel und Biozide gewählt, die frei von Einschränkungen entweder im Baumarkt oder in der Apotheke gekauft werden können.

Versuchsreihe (2010); Investigation of effectiveness of mold detergents and chemicals on total cell numbers of mold on building materials:

„Eine Reinkultursuspension *Aspergillus* spp. wurde auf 2*2cm große Tapetenstücke mit 500 µl beimpft und auf einem DG18 Agar im Brutraum bei 24°C inkubiert. Als Desinfektionsmittel wurden Jati, 6% H₂O₂ und 70% Isopropanol ausgewählt. Die Vergleichsprobe war eine Charge mit destilliertem Wasser. Die bewachsenen Tapetenstücke wurden in leere Petrischalen gelegt und mit dem jeweiligen Mittel reichlich besprüht und nach 1 Minute, 2 Stunden, 24 Stunden und 1 Woche gefärbt und gezählt. Nach der Behandlung mit dem jeweiligen Desinfektionsmittel wurden die Tapetenstücke wieder auf DG18 Agar gelegt um optimale Bedingungen zu simulieren [1].“

Ergebnis des Versuches war, dass sich die Zellen offensichtlich bereits nach 24 Stunden weitgehend regeneriert hatten. Einzig Isopropanol konnte das Wachstum wirksam hemmen. Die Biomasse konnte nicht dauerhaft reduziert werden [1].

Basierend auf den Ergebnissen des vorangegangenen Versuches 2010 sollen die Versuchsbedingungen so modifiziert werden, dass die Desinfektionsmittel optimal wirken können. Dem Schimmelpilz stehen nach der Desinfektion weder frisches Nährmedium noch Feuchtigkeit zur Verfügung. Weder der pH-Wert noch der Sauerstoffgehalt in der Probe werden reguliert. Der Versuchsablauf

simuliert einen behandelten Befall nach vorangegangener Abtrocknung der befallenen Stelle im Innenraum.

3 Grundlagen

3.1 Schimmelpilze

Unter dem Begriff Schimmelpilze wird eine Gruppe von ubiquitär vorkommenden Fadenpilzen zusammengefasst, die keine taxonomisch einheitliche Gruppe darstellt, sondern erfasst jene Pilze, die sich an vergleichbare ökologische Lebensräume angepasst haben. Die so zusammengefassten Pilze erfüllen ähnliche physiologische und ökologische Merkmale. Schimmelpilze gehören zu den beiden großen Gruppen der Oomycota und Eumycota. Sie wachsen bevorzugt an feuchten Orten auf organischen Materialien, Lebensmitteln, Holz, Tapeten, Gipsplatten usw. und tolerieren breite Temperaturbereiche von 0–60 °C. Der Hauptanteil der Schimmelpilze gehört der Hauptgruppe der Zygo- und der Ascomyceten an, die zu der großen Gruppe der Eumycota gehören. Alle Schimmelpilze bilden apikal wachsende Hyphen, die man in ihrer Gesamtheit als Myzel bezeichnet. Während des Wachstums sind die Hyphen meist farblos und haben einen Durchmesser von ca. 4–10 µm und sind so für das menschliche Auge nicht sichtbar. Je nach Art unterscheidet sich die Morphologie der Hyphe. So bilden Asco- und Basidiomyceten septierte Hyphen, Oomyceten und Zygomyceten unseptierte Hyphen aus. Neben dem vegetativen Hyphenwachstum können sich die meisten Schimmelpilze sowohl sexuell (telemorph; sehr selten) als auch asexuell (anamorph) fortpflanzen [2]. Zu diesem Zweck differenzieren sich an dem vegetativen Myzel bereits nach kurzer Zeit Sporenträger, die dem Schimmelpilz durch die meist gefärbten Sporen sein morphologisches Erscheinungsbild verleihen. Andere bilden ihre Sporen, indem sie Zellfäden aus abgezweigten Hyphen abschnüren. Sichtbar wird der Schimmel erst wenn die Stellen dicht bewachsen sind (Koloniebildung) [3]. Ob eine sexuelle oder asexuelle Sporenbildung eintritt, hängt von der Pilzart und den vorherrschenden Wachstumsbedingungen ab. Es werden große Mengen der vegetativen Sporen über die Luft verbreitet. Da die Größe der Sporen zwischen 3 – 20µm liegt,

werden sie unbemerkt mit eingeatmet. Die Sporen dienen auch als Dauerform. Je nach Pilzart wird die Flugfähigkeit der Sporen in 3 Klassen unterteilt (1. schlechte Flugfähigkeit, 2. mittlere Flugfähigkeit, 3. gute Flugfähigkeit). Sowohl Sporen als auch Myzelstücke sind in der Lage bei geeigneten Bedingungen und Substrat wieder auszukeimen um so neue Kolonien zu bilden [2]. Abhängig von Standort, Klima, Jahreszeit und meteorologischen Bedingungen unterliegt die Konzentration der Sporen und Artenzusammensetzung der Pilze starken Schwankungen. Von den rund 250 000 bekannten Pilzarten kommen ca. 100 im Innenraum auf Baumaterialien vor [4].

3.1.1 Schimmelpilz Wachstum in Gebäuden und Innenräumen

Schimmelpilze finden in Gebäuden ideale Wachstumsbedingungen. Die Temperaturen liegen um 20 °C und potenzielle Substratquellen und Sauerstoff sind immer ausreichend vorhanden. In der Praxis siedeln sich meistens mehrere Schimmelpilzarten an einem Ort an. Damit einhergehend können sich auch Bakterien und andere Kleinstlebewesen (z.B. Milben) ansiedeln, auf die aber trotz ihrer Schädlichkeit für den Menschen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird [3].

Man unterscheidet zwischen einem „sichtbaren Befall“, einem „versteckten Befall“ und einem „nicht sichtbaren Befall“.

Von einem versteckten Befall spricht man, wenn der Schimmel nicht direkt sichtbar ist, aber zum Vorschein kommt, wenn Tapete, Wandverkleidungen entfernt werden oder Möbel verrückt werden.

Von einem nicht sichtbaren Befall wird gesprochen, wenn der Befall zwar an der Oberfläche von beispielsweise Tapeten, Putz usw. liegt, aber visuell nicht wahrgenommen werden kann [3].

Je nach Art des Pilzes können diese auch als s.g. Indikatorkeime für Feuchteschäden fungieren. Schimmelpilze benötigen minimale Wachstumsbedingungen und zeichnen sich durch ihre Anspruchslosigkeit aus. Bei einem andauernden Befall ist es egal, ob der Schimmel eine maximale Wachstumsrate zeigt oder nur gehemmt wächst [3].

3.1.2 Feuchtigkeit

Der ausschlaggebende Faktor für das Wachstum im Innenraum ist der durch den a_w -Wert gekennzeichnete Gehalt des „freien Wassers“. Dabei muss das als Substrat dienende Material selbst nicht unbedingt nass oder feucht sein. Eine relative Luftfeuchtigkeit von ca. 80% ist ausreichend, um das Pilzwachstum zu induzieren, selbst wenn der Gehalt nur von kurzer Dauer ist (nach dem duschen, kochen usw.). Einige Schimmelpilze sind sogar in der Lage, nach einer einmal stattgefundenen Sporulation, sich auch bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 70% zu entwickeln. Ist Feuchtigkeit beispielsweise nach einem Wasserschaden ständig verfügbar, so fördert das verbliebene Wasser das Ansiedeln und Wachstum von Schimmelpilze. Ein wichtiger Effekt des Schimmelpilzwachstums in Innenräumen ist aber auch, dass Schimmelpilze während ihres Wachstums unterschiedliche Ansprüche an den Feuchtigkeitsgehalt stellen. Bereiche, in denen sich die verfügbare Wassermenge (z.B. im Badezimmer) immer wieder ändert, begünstigen daher das Wachstum [3].

„Die häufigste Ursache, die zu einer hohen Materialfeuchte in Wohnräumen und zu einem Schimmelpilzwachstum führen, sind zum einen Leitungshavarien und falsche Bauausführungen (...) und zum anderen fehlerhaftes Nutzerverhalten (...)“ [5].

3.1.3 Substrat

Obwohl es unter den Schimmelpilzen Spezialisten gibt, die besondere Anforderungen an Substrat und Umgebung stellen, zeichnen sich die meisten Arten durch ihre „Anspruchslosigkeit“ aus. Als Substrat (C-Quelle) können feuchtes Holz, Papier, Teppich, Farben, Leder, Kleber, Silikone, Gipskarton dienen. Kohlenstoffquellen können aber auch zellulosefreie Kunststoffe oder Weichmacher sein. Lösemittelhaltige Stoffe, wie Klebstoffe oder Mineralwollen die bei ihrer Herstellung mit Paraffinöl oder ähnlichem versetzt wurden, stellen eine ausreichende C-Quelle für das Wachstum dar. Darüber hinaus können auch Materialien besiedelt werden, die selbst keinerlei Nährstoffe bieten. Im Staub befinden sich u.a. auch organische Partikel. So kann sich durch eine

vorausgegangene Staubablagerung und Tauwasserbildung auf Oberflächen wie Glas oder Metall ein Biofilm bilden, der dem Schimmelpilz dann als Substrat dienen kann. Auch alkalische Baustoffe wie beispielsweise Beton können dann besiedelt werden [4].

Schimmelpilze können in mineralischen Baustoffen die Bindemittel zersetzen (Versandung von Putz). Viele können Zellulose verwerten und neben Tapeten, Büchern auch tragende Balken befallen oder die Struktur des Holzes angreifen (Enzymatischer Abbau durch Oxidasen). Auch die in Farben und Anstriche enthaltenen Tenside und Weichmacher können von Schimmelpilzen abgebaut werden. [2]

3.1.4 pH-Wert

Schimmelpilze können im Bereich zwischen pH 3–9 wachsen. Der optimale Bereich liegt zwischen pH 5 und 7. Bezieht man auch Schimmelpilze ein, die extreme pH-Werte tolerieren, reicht das Wachstumsspektrum von pH 2–11 [6]. Tapeten und Anstriche liegen im Allgemeinen mit ihren pH-Werten zwischen 5 und 8 (Raufasertapeten, Kunstharz-Dispersionsanstriche). Kalkhaltige Baustoffe wie Putz-Mörtel, Estrich oder Beton besitzen pH-Werte um 12. Trotzdem können sie besiedelt werden. Zum einen verschiebt sich der pH-Wert mit der Zeit in neutrale Bereiche, zum anderen kann ein Befall Folge von Staubablagerungen sein. Selbst wenn Beton und Estrich frisch verbaut sind, kann es zu einem Befall kommen. Weist beispielsweise Estrich unter dem verbauten Bodenbelag eine hohe Restfeuchte auf, bildet sich eine hohe relative Luftfeuchtigkeit in dem Raum zwischen Estrich und Bodenbelag aus. Der pH-Wert des Estrichs würde zwar hemmend auf Mikroorganismen wirken, aber durch das verfügbare Wasser kann der Kleber des Dämmmaterials oder das Material selbst dann als Substratquelle genutzt werden [3].

3.2 *Aspergillus versicolor*

Aspergillus (*Asp.*) *versicolor* ist einer der am häufigsten in Innenräumen vorkommende Schimmelpilz [3]. Die Kolonien wachsen je nach Substrat in verschiedenen Farben, daher auch die Bezeichnung „*versicolor*“. Der Organismus ist sowohl für Menschen als auch Tiere toxisch und pathogen. Die von ihm synthetisierten Aflatoxine werden mit verschiedenen Krebsarten in Verbindung gebracht [7]. Mit einem a_w -Wert von 0,74–0,78 ist er xerophil [3]. Er toleriert breite pH-Werte pH 3–8 und Temperatur Bereiche 4°–40°C. Das Optimum liegt entsprechend der geografischen Herkunft bei 21–22°C oder 25–30°C [7]. Als Substrat im Innenraum können u.a. Glaswolle (Inhaltsstoffe), Kunststoff, Styropor, Putz, Mörtel, Holz, Gipskarton oder Tapete genutzt werden [3] C-Quellen für *Aspergillus versicolor* sind hier u.a. D- oder L- Apfelsäure, Stärke, Fructose, Galactose, Glucose, Maltose, Paraffin, Raffinose, Saccharose, Atropinsulfate [7]. Die gebildeten Sporen haben einen Durchmesser von 2–3,5µm und haben die Flugfähigkeit der Klasse 3 (=gute Flugfähigkeit) [3]

3.3 Analysemethoden zum Auffinden des Befalls

Es gibt kein Analysen-Verfahren, welches das gesamte Ausmaß der Belastung mit einer Messung aufklären kann. Um den wahren Sachverhalt eines Befalls aufzuklären, ist es nötig, mehrere Analyse-Verfahren zu kombinieren. Symptome, die bei Bewohnern auftreten, können erste Indizien sein. Ist der Befall nicht sichtbar, können MVOC Tests einen versteckten Befall anzeigen.

Bei mikrobiologische Luftanalysen werden neben der Gesamtzellzahl/-partikel auch die koloniebildenden Einheiten bestimmt. Mit der Methode können u.a. Hinweise auf Indikatororganismen gefunden werden. Die Analysen können zwar anzeigen, dass ein Befall da ist, nicht aber das wahre Schadensausmaß bewerten. Nachgewiesen werden Schimmelpilze, die sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits vom Material entsprechend ihrer Flugfähigkeit getrennt hatten. Allerdings werden mit diesem Verfahren auch falsch positive Ergebnisse von Schimmelpilzarten angezeigt. Da Schimmelpilze immer als

Hintergrundwerte in der Luft vorhanden sind, werden auch die Arten erfasst, von denen ein Raum nicht befallen ist. Um die Belastung abschätzen zu können, müssen die Außenluftkonzentrationen mit begutachtet werden.

Staubanalysen zeigen an, welche vorhandenen Arten Trockenheit und Licht über längere Zeiträume überstehen. Sie geben also im Gegensatz zu Luftanalysen Auskunft über eine Kontamination, die über einen längeren Zeitraum stattgefunden hat (Tage, Wochen). Erfasst werden die sedimentierten, anzüchtbaren Keime, deren Flugfähigkeit sich in Grenzen hält. Beispielsweise können Sporen des toxischen *Stachybotrys chartarum* im Staub gefunden werden. Aufgrund seiner schlechten Flugfähigkeit kann er in Luftproben oft nicht nachgewiesen werden [3].

Werden die Proben mit dem nötigen Sachverstand an den richtigen Stellen genommen, *liefern Materialproben die zuverlässigsten Ergebnisse*. Der Ort der Entnahme richtet sich u.a. nach der Fragestellung. Fallen die Beurteilungen der einzelnen Proben negativ aus, ist es wahrscheinlich, dass der Bereich der Entnahmestelle nicht befallen ist. Grundsätzlich ist aber anzumerken, dass selbst wenn mehrere Proben negativ ausfallen, ein Befall nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Probenentnahme sowie Analysemethoden müssen dazu geeignet sein, einen Befall erfassen zu können [8].

3.4 Bewertungskriterien nach Labor Urbanus GmbH

Tab. 1 Beurteilung der Ergebnisse einer erweiterten mikrobiologischen Materialuntersuchung von Labor Urbanus GmbH, Düsseldorf; Schimmelpilze, gekürzt [8]

Bezeichnung der Analyse	Normalwerte pro cm ²	Normalwerte pro g
Gesamtzellzahl (Gz)	<10.000	<100.000
Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE)	<1.000	<10.000
Anzahl biochemische Aktivität (BA)	<1.000	<10.000

Die Einstufung basiert auf mehr als 200.000 Materialproben im Verlauf von mehr als 20 Jahren [8].

Tab. 2 Beurteilung der GZ, KBE & BA nach Labor Urbanus GmbH [8]

Normale Werte	Hintergrundwerte
Etwas erhöht	10–fach über dem Normalwert
Erhöht	100–fach über dem Normalwert
Stark erhöht	1000–fach über dem Normalwert

3.5 Sanierungsmaßnahmen

Ziel einer Sanierung ist es, den hygienischen Normalzustand wieder herzustellen, das bedeutet nicht Keimfreiheit [9]. Es gibt keine einheitlichen Sanierungsverfahren. Darüber hinaus ist eine Sanierung nur dann sinnvoll, wenn die Ursachen für den Befall abgeklärt und behoben worden sind. Beim Entdecken des Schimmelbefalls ist es sinnvoll, Sofortmaßnahmen einzuleiten. Daraus dürfen aber keine Dauermaßnahmen werden. Bei sämtlichen Maßnahmen der Sanierung ist neben der eigenen Sicherheit darauf zu achten, dass keine Stäube produziert werden oder durch Aufwirbelungen noch mehr Sporen oder Myzelstücke in die Luft gelangen. Selbst im abgetöteten Zustand geben viele Schimmelarten noch allergisch wirkende oder reizend wirkende Stoffe ab. Außerdem könnten sie so leicht an andere Stellen oder in andere Räume gelangen und dort zu einem erneuten Befall führen¹ [6].

In einer Presseinformation von 2009 empfiehlt das Umweltbundesamt allerdings die fachgerechte Sanierung ohne Desinfektionsmittel. Eine fachgerechte Sanierung "umfasst die Beseitigung der Ursachen, die zum Feuchteschaden und damit zum Schimmelpilzwachstum führten, die Reinigung von mit Schimmelpilz befallenen Materialien, wo dies möglich ist, deren Entfernung

¹ Allergiker, Chronische Atemwegs Erkrankungen und Immungeschwächte ausgeschlossen

sowie eine abschließende Feinreinigung der ganzen Wohnung um vorhandene Schimmelpilzsporen zu beseitigen“ [10].

„Wenn der Schimmelpilzbefall vollständig entfernt und durch fachgerechten Wiederaufbau eine erneute Feuchtebildung ausgeschlossen ist, ist eine Desinfektion nicht erforderlich“ [6]

Viele Desinfektionsmittel sind wegen der fehlenden Wirksamkeit in der Praxis unbrauchbar. Außerdem ist die Wirkung oberflächlich und von kurzer Dauer, auch wenn in Laborversuchen ihre Wirksamkeit nachwiesen werden kann. Selbst wenn das Desinfektionsmittel wirksam wäre, die gesundheitliche Problematik würde fortbestehen. Abgetötete Sporen, Bakterien usw. würden weiterhin Allergene und Toxine abgeben (u.a. Endotoxine). Nach durchgeführter Desinfektion besteht die Gefahr, dass Desinfektionmittelreste oder Reaktionsprodukte eingeatmet werden könnten. Auch hier besteht die Gefahr von allergischen Reaktionen oder Schadstoffbildung. Falsch ausgeführte Sanierungsmaßnahmen können dazu führen, dass der pH-Wert von Bauteilen unvorteilhaft in den neutralen Bereich verschoben wird. In Verbindung mit Feuchtigkeit wird dadurch ein erneuter Befall zusätzlich begünstigt [10].

„Die Wirksamkeit und Dauerhaftigkeit der vorgegebenen Eignung der verwendeten Materialien, Mittel und Verfahren muss durch wissenschaftliche und praktische Untersuchungen belegt sein“ [6].

3.6 Desinfektionsmittel

Def:“ Desinfektion ist die selektive Abtötung bzw. irreversible Inaktivierung aller krankheitserregenden Keime an und in kontaminierten Objekten“ [11]. Die mikrobizide Wirkung hängt von einer Reihe stoffspezifischer Einflussgrößen ab. Im Vergleich sind die zentralen Einflussfaktoren: Einwirkzeit, Einsatzkonzentration und Wirkungsspektrum am wichtigsten. Sie sind direkt voneinander abhängig. Einflussgrößen wie pH-Wert, Temperatur usw. bestimmen neben den drei zentralen Faktoren die Bereiche, in denen das Desinfektionsmittel eingesetzt werden soll [12].

3.6.1 Einwirkzeit, Konzentration und Wirkspektrum

Der größte Teil der Mikrobiozide wirkt nur in höheren Konzentration desinfizierend. Anwendungstechnisch sind die meisten Konzentrationen auf kurze Wirkzeiten ausgelegt. Bei zu niedriger Dosierung werden die Mikroorganismen lediglich gehemmt, ggf. kann es auch zu Adaptionen kommen. Resistenzbildungen sind mit zunehmend unspezifischer Schädigung auf die Zellen unwahrscheinlicher; beispielsweise bei Oxidationsmitteln oder Halogenen. In manchen Fällen können eine hohe Konzentration und lange Einwirkzeiten bestehende Wirkungsschwächen ausgleichen. Bei entsprechendem Verschmutzungsgrad kann es auch passieren, dass Desinfektionsmittel die Mikroorganismen gar nicht erst erreichen. Die zu wählenden Einsatzkonzentrationen sind wirkstoffspezifisch und müssen vom Milieu und Verwendungszweck abhängig gemacht werden. Letztlich ist es meist eine Frage der Konzentration, ob ein Stoff keimtötend oder nur hemmend wirkt [12].

3.6.2 pH-Wert

pH-Werte beeinflussen die Dissoziation von Säuren und damit auch ihre antimikrobielle Wirkung, da meist nur der undissoziierte Säureanteil mikrobizid wirksam ist. Einmal dissoziiert verlieren viele Stoffe ihre Wirkung, weshalb die meisten Desinfektionsmittel nur in bestimmten pH-Bereichen optimal wirken können [12].

3.6.3 Temperatur

In der Regel beschleunigt eine erhöhte Temperatur die Wirksamkeit. Zum einen verändern sich die allgemeinen physikalisch-chemischen Eigenschaften, beispielsweise die Löslichkeit. Zum anderen erhöhen viele Mikroorganismen ihren Stoffumsatz und nehmen dadurch den Wirkstoff verstärkt auf [12].

3.6.4 Feuchtigkeit und Verteilungskoeffizient

Eine wichtige Voraussetzung für chemische Desinfektionsmittel ist die Anwesenheit von Wasser als Lösungsmittel, um den Transport in die Zelle zu gewährleisten. Die biochemischen Prozesse, in die eingegriffen werden soll, laufen immer in wässriger Phase ab. Wie schnell ein Mittel wirken kann, ist abhängig vom Verteilungskoeffizienten, der ausschlaggebend für das Passieren der hydrophilen und lipiden Schichten ist. Der Koeffizient beschreibt die Geschwindigkeit, mit der sich ein Stoff zwischen zwei nicht mischbaren Phasen verteilt [12].

3.7 Ausgewählte mikrobizide Stoffgruppen

3.7.1 Alkohole

Alkohole sind leicht entzündlich, flüchtig und zeigen unter den Mikrobiziden die schnellste Abtötungsgeschwindigkeit. Um den Eintrag in die Zelle zu gewährleisten, darf der reine Alkoholgehalt nicht höher als 70% sein. Wegen der bestehenden Explosionsgefahr durch entstehende Dämpfe eignet sich der Alkohol nur zur Desinfektion kleinerer lokaler Stellen. Besonders Isopropanol wirkt reizend (Augenbindehaut). Für Mauerwerk oder Metalle besteht aber aufgrund der Flüchtigkeit keine Gefahr [9]. Pilze werden nicht von allen Alkoholen gleich gut abgetötet, darüber hinaus sind sie gegen Sporen unwirksam. Das pH-Optimum liegt im schwach sauren Bereich [12].

3.7.2 Carbonsäuren

Carbonsäuren und ihre Derivate, wie im Jati-Schimmelpilz-Entferner enthalten (Benzoe- und Sorbinsäure), wirken nur in der undissoziierten lipophilen Form

antimikrobiell. Der Säureanteil hemmt Stoffwechsellzyme, zerstört Zellmembranen, hemmt unspezifisch den aktiven Transport durch die Cytoplasmamembran oder denaturiert Proteine. Um eine mikrobizide Wirkung zu gewährleisten, sind Carbonsäuren an einzelne pH-Werte und stoffspezifische Mindestkonzentrationen gebunden. Benzoesäure wirkt nur dann fungistatisch, wenn sie in einer Wirkstoffkonzentration von 500–1000 µg/ml vorliegt. Sorbinsäure, benötigt eine Wirkstoffkonzentration von 25–500 µg/ml. Außerdem ist zu beachten, dass stärkere Säuren nur in sauren pH-Wert Bereichen in der undissoziierten Form vorliegen. Schwache Säuren wirken auch in den schwach sauren neutralen Bereichen. Benzoesäure und Salizylsäure haben ihr pH-Optimum bis pH 5 und benötigen für die angegebenen Konzentrationen Einwirkzeiten von mindestens 72 Stunden, um wirksam sein zu können [12].

3.7.3 Chlorspalter

Halogene sind starke Oxidationsmittel, stören Redoxvorgänge des Stoffwechsels und reagieren mit Proteinen und Nukleinsäuren zu N-Halogenen Verbindungen. Ein typischer Vertreter hier ist Natriumhypochlorid (Chlorbleichlauge). Es wirkt auf der Haut, Augen und Schleimhäute stark ätzend. In wässriger Lösung bildet sich die eigentlich antimikrobiell wirkende Verbindung HClO. Das pH Optimum liegt zwischen pH 4–7, in diesem Bereich liegt die unterchlorige Säure nahezu undissoziiert vor. Um fungizid wirken zu können muss das frei verfügbare Chlor eine Wirkstoffkonzentration von 100 µg/ml (für *Asp. niger*) aufweisen [12].

3.7.4 Wasserstoffperoxid

Es ist ein starkes, chemisch instabiles Oxidationsmittel, das beim Zerfallen aktiven Sauerstoff freisetzt. Gerade zur Abtötung von Schimmelpilzen müssen höhere Konzentrationen eingesetzt werden. Allerdings wirken Peroxide grundsätzlich sehr gut mit organischen und anorganischen Substanzen. Die

antimikrobielle Wirkung wird also daher stark durch das Milieu beeinflusst. Das pH-Optimum liegt im schwach sauren Bereich. Um fungizid wirken zu können muss Wasserstoffperoxid mit einer Wirkstoffkonzentration von 2500-10000µg/ml vorliegen [12]. Meist werden Konzentrationen < 20% eingesetzt. In entsprechenden Konzentrationen zeigen sich ätzende Wirkungen auf Augen und Haut. Beim Einatmen der Dämpfe können die Atemwege gereizt werden [9].

4 Material und Methoden

4.1 Geräte, Material, Chemikalien & Mikroorganismus

Mikroskop; Olympus BH2–RFC, Reflected light Fluorescence Attachment

Polycarbonat-Filter; GE Water & Process Technologies, Black 0.4 Micron Durchmesser (25mm)

Objektträger und Deckgläschen; Thermo Scientific, Menzel Gläser geschnitten (76*26mm), Deckgläschen (22*22mm)

Isopropanol (IPA); EG-Nr. 200–661–7; 2-Propanol 70% (V/V) Hetterich; Pharmazeutischer Unternehmer Teofarma srl, 100g Lösung enthalten 62,8g 2–Propanol & gereinigtes Wasser

Jati-Schimmelpilz-Entferner; EG-Nr.1999/45/EG; JatiProdukts; < 5% Bleichmittel auf Sauerstoffbasis, 45–50 g/l g/100g Wasserstoffperoxid

Ceresit–Anti–Schimmel; EG-Nr. 1907/2006 Natriumhypochlorit 3%, Natriumcarbonat 1– < 5%, Natriumhydroxid < 1%, Natriumoctylsulfat < 2%; Henkel AG & Co.KGaA

Wasserstoffperoxid (H₂O₂); EG-Nr. 231–765–0 Löwen Apotheke 200 ml enthalten 12% stabilisiertes H₂O₂

Acridine Orange; Acridine Orange Zinkchlorid ($C_{17}H_{20}Cl_3N_3Zn$); 438,09 g/mol,
Synonyme: Basic orange 14

Fluorescein diacetate; ($C_{24}H_{16}O_7$); 416,38g/mol; Synonyme: 3,6-
Diacetoxyfluoran; Di-O-acetylfluorescein

Puffer für FDA; A: 14,20g Na_2HPO_4 + 500ml dest. H_2O , B: 6,24g NaH_2PO_4 +
200ml dest H_2O , 405ml Lsg. A + 95ml Lsg. B + 500ml dest H_2O

Verwendetes Nährmedium; Dichloran-Glycerin; 15,75g DG 18-Agar, 110ml
Glycerin, 500g dest. H_2O , 0,75ml Chloramphenicol

Waschlösung; 9g NaCl, 1l dest H_2O , 0,5ml Tween 80

Gepufferte Waschlösung; 3,25g KH_2PO_4 , 7,27g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 4,3g NaCl,
0,1ml Tween 80, 1l dest H_2O

Aspergillus versicolor; entnommen aus Reinkultur (Wildtyp)

4.2 Ermittlung der optimalen Beimpfungsmethode der Tapete zur Herstellung homogenen Probenmaterials

Als Modellorganismus wird *Aspergillus versicolor* gewählt. Er ist ein typischer Vertreter der zu den Indikatororganismen eines Feuchtigkeitsschadens gehört und lässt sich typischerweise auf befallenen Tapeten nachweisen. Als Testmaterial wird eine handelsübliche unbehandelte Raufasertapete aus dem Baumarkt genutzt. Um durch Transport und Lagerung entstandene Verschmutzungen ausschließen zu können wird das Teststück aus einem weitabgerollten inneren Teil der Tapete entnommen. Das Testmaterial ist frei von antimikrobiell wirkenden Inhaltsstoffen. Die Tapetenstücke werden mit einer zuvor desinfizierten Schneidemaschine auf 2*2cm zu geschnitten. Um einen

realitätsnahen Zustand für den Versuch zu simulieren, wird darauf verzichtet, die Tapetenstücke vorher zu autoklavieren. Von einer auf DG 18 Agar gewachsenen *Aspergillus versicolor* Kultur werden 0,13g (ca. 2 ½ Kolonie) in einem Fallkornröhrchen eingewogen und mit 12ml Waschlösung versetzt und verschlossen. Das Myzel wird 1,5 Minuten in ein Ultraschallbad feinverteilt. Aus der Suspension wird 100µl entnommen, 1:10 verdünnt, mit AO und FDA angefärbt und ausgezählt. Die Zählung der Startkultur ergab eine Gesamtzellzahl von $1,8 \cdot 10^9$ Mikroorganismen; BA war positiv.

Die vorbereiteten Tapetenstückchen werden unterschiedlich mit der *Asp. versicolor* Suspension beaufschlagt:

V1–Methode: Auf die Oberseite der Tapete werden mittig 300µl der Suspension pipettiert

V2–Methode: In eine Petrischale werden 1ml Suspension gegeben und alle Tapetenstücke werden mit der Oberseite benetzt.

Die Tapetenstücke werden anschließend, mittig auf DG 18 Agar Platten gelegt. Die benetzte Seite nach oben, sodass diese nicht direkt auf dem Agar liegt. Die Schalen werden verschlossen und eine Woche lang bei 25°C inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, dass V2–Methode die geeignetere Methode zur Herstellung von Probenmaterial darstellt.

4.3 Versuchsdurchführung

Einer auf DG 18 Agar gewachsenen *Aspergillus versicolor* Kultur werden 0,32 g (ca. 3 Kolonien) entnommen und in 30ml gepufferter Waschlösung für 1,5 Minuten in einem Ultraschallbad dispergiert. Die Lösung wird 1:10 verdünnt, gefärbt und ausgezählt. Die Zählung ergab eine Gesamtzellzahl von $9,9 \cdot 10^8$; BA war positiv.

Basierend auf den Ergebnissen des Vorversuchs zur Herstellung homogenen Probenmaterials werden die Tapetenstücke nach Methode V2 beimpft und auf DG 18 Agar gelegt. Eine Charge besteht aus 8 Probe–Platten. Die beimpften Tapeten werden für 10 Tage bei 25°C inkubiert. Um zu verhindern, dass

eventuell Sporen aus der Probe verloren gehen und so das Ergebnis verfälschen, wird darauf geachtet, dass die Petrischalen waagrecht und frei von Erschütterungen bleiben. Auf den bewachsenen Tapetenstücken konnten keine anderen Schimmelpilzarten als *Asp. versicolor* detektiert werden.

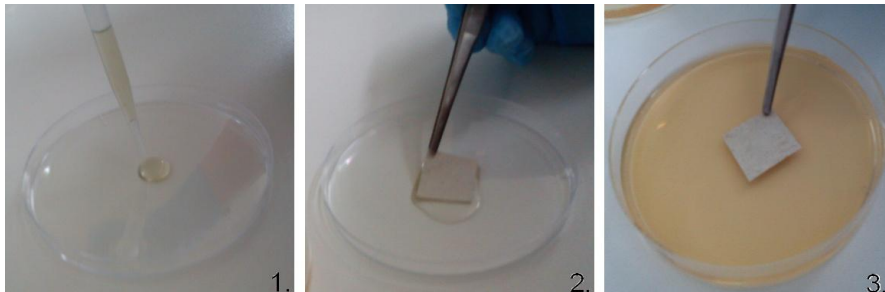


Abb. 1 Ablaufs der Beimpfens V2-Methode: 1: 1 ml der *Asp. versicolor* Suspension wird in eine leere saubere Petrischale gegeben 2: Das 2*2 cm große Tapetenstück wird mit der Oberseite eingetaucht und vollständig benetzt 3: das Tapetenstück wird mit der unbenetzten Seite auf den DG 18 Agar gelegt

Nach 10 Tagen werden die bewachsenen Tapetenstücke vom Agar entfernt und in die zuvor beschrifteten Petrischalen gelegt. Beim Überführen vom Agar in die Petrischalen wird darauf geachtet, dass die bewachsene Seite nicht mit der desinfizierten Pinzette in Berührung kommt. Nährmedienreste, die an der Tapete haften bleiben, werden abgeschabt. Proben, bei denen der Schimmelpilz über das Papier hinaus in den Agar wuchs, werden vorsichtig mit einem desinfizierten Skalpell ausgeschnitten und dann überführt.

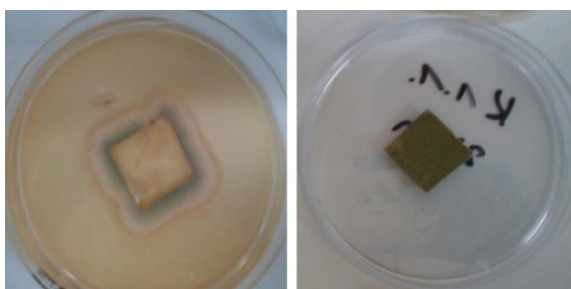


Abb. 2 Tapetenstücke nach 10 tägiger Inkubation; Das überwucherte Tapetenstückchen wurde mit einem Skalpell aus dem DG18 Agar ausgeschnitten und in eine vorbeschriftete Petrischale zur weiteren Behandlung gelegt.

Die Chemikalien, die zur Desinfektion genutzt wurden:

- Isopropanol (IPA) 70%,
- Jati-Schimmelentferner,
- Ceresit-Anti-Schimmel
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂)12%.

Als Referenzgruppe wurde dest. Wasser gewählt. Die Proben werden mit den jeweiligen Desinfektionsmitteln aus ca. 30 cm Entfernung eingesprüht. Der verwendete Sprühkopf bringt 1,3 g des Wirkstoffes auf Tapetenstücke auf. Die Proben bleiben max. 24 Stunden unbedeckt in einem Raum mit gleichbleibend niedriger Luftfeuchtigkeit, damit die eingebrachte Feuchtigkeit verdunsten kann. Die Proben werden nach spätestens 24 Stunden mit einem beschrifteten Deckel versehen und in den Brutraum gebracht. Nach 2 Stunden, 24 Stunden, 6 Tagen und nach einem Monat Inkubationszeit werden die Gesamtzellzahl, biochemischen Aktivität und die koloniebildenden Einheiten der Proben bestimmt. Da in dem vorangegangenen Versuch 2010 [1] ermittelt wurde, dass sich die Werte der GZ, BA und KBE nach 1 Minute und 2 Stunden nicht signifikant unterscheiden, wird auf die Probenentnahme nach einer Minute verzichtet.

Die auf DG 18 Agar inkubierten Tapetenstücke werden mit einer desinfizierten Pinzette in ein zellfreies Fallkornröhrchen überführt und mit 12ml Waschlösung versetzt und verschlossen. Das Tapetenstück mit dem Myzel wird 1,5 Minuten in einem Ultraschallbad feinverteilt. Aus der Probensuspension werden 100µl entnommen und für die Bestimmung der GZ, BA und KBE genutzt.

4.3.1 Ermittlung der Gesamtzellzahl nach Färbung mit Acridine Orange (AO)

100µl der Probensuspension (wie beschrieben) werden in einen Färbetrichter mit vorgelegten, 2ml gefilterten dest. H₂O gegeben. Es werden 2–3 Tropfen AO dazugegeben und das Reaktionsgefäß ein paar Mal leicht geschüttelt. Nach 15–30 Sekunden Reaktionszeit wird das Gemisch mit Hilfe einer

Vakuumpumpe über den zuvor eingelegten Polycarbonat–Filter in ein dafür vorgesehenes Abfallgefäß abgesaugt. Der Filter wird entnommen und auf einen Objektträger gelegt. Es ist darauf zu achten, dass sich die Seite mit Mikroorganismen oben befindet. Der Filter wird mit einem Tropfen Immersionsöl versehen und mit einem Deckgläschen bedeckt. Das Präparat muss innerhalb von 2 Stunden mikroskopiert werden und im Dunklen aufbewahrt werden.

AO ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich unterschiedlich an die Phosphatgruppen der DNA und RNA bindet. Je nachdem, ob die Farbmoleküle aufgrund des Abstandes noch in Wechselwirkung miteinander treten können, fluoresziert der Farbstoff orangerot oder grün.

4.3.2 Ermittlung der biochemischen Aktivität nach Färbung mit Fluoresceindiacetate (FDA)

In einem Reagenzglas werden 6 ml Puffer vorgelegt, 100 µl der unverdünnten Probensuspension (wie beschrieben) und 50 µl FDA pipettiert. Nach 3 Minuten wird der komplette Inhalt in einen Trichter gegeben, und die Zellen durch Vakuumfiltration auf einen Polycarbonat–Filter aufgebracht. Der Filter wird entnommen und auf einen Objektträger gelegt. Es ist darauf zu achten, dass sich die Seite mit Mikroorganismen oben befindet. Der Filter wird mit einem Tropfen Immersionsöl versehen und mit einem Deckgläschen bedeckt. Das Präparat muss innerhalb einer Stunde mikroskopiert werden und im Dunklen aufbewahrt werden.

FDA ist ein nicht fluoreszierendes unpolares, hydrophobes Fluoreszinderivat, das die Zellwand durchdringt und in der Zelle durch unspezifische Esterasen zu einem polaren fluoreszierendem Farbstoff hydrolysiert wird. Nur intakte Zellen zeigen Esterasenaktivität und können den hydrolysierten Farbstoff in der Zelle halten und sind so unter einem Auflichtfluoreszenzmikroskop von den Stoffwechsellinaktiven Zellen zu unterscheiden.

Die Untersuchung der GZ und BA wird mit einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Vergrößerung von 1250 durchgeführt. Die Sporen– und Myzelfragmente werden von 40–100 Sichtfeldern ausgezählt. Normalerweise werden 40 Felder

gezählt. Ist aber die Konzentration der Mikroorganismen so groß, dass sie in ihrer Anzahl 400 übersteigt kann die Zählung gestoppt werden. Werden auf 40 Felder nicht mehr als 10 Organismen gezählt, muss die Zählung auf 100 Felder erweitert werden.

Um die KBE zu bestimmen wird eine Verdünnungsreihe bis $1:10^5$ angelegt. 100 μ l der Probensuspension (wie beschrieben) werden mit einem Drigalskispatel auf dem DG18 Agar aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Die Platten werden nach einer Woche bei 25°C im Brutraum inkubiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

5 Resultate

In Abbildung 3 ist die GZ der beiden unterschiedlichen Beimpfungsmethoden (V1-Methode und V2-Methode) der Tapetestückchen zur Herstellung homogenen Probenmaterials gegenübergestellt.

5.1 Herstellung Homogenes Probenmaterial

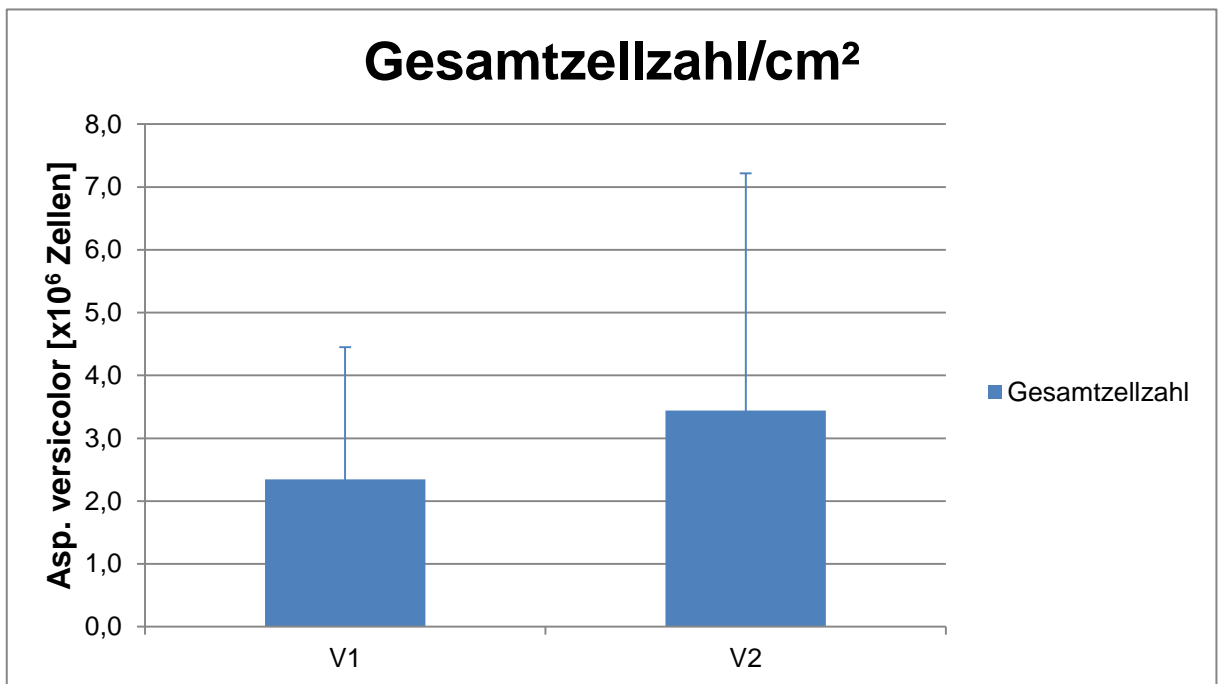


Abb. 3 Mittelwerte der Gesamtzellzahl/cm² Aspergillus versicolor der aus der Reinkultur; Differenz der Gesamtzellzahl \approx 42%; GZ der Startkultur \approx $1,8 \cdot 10^9$

Tab. 3 Mittelwerte der Gesamtzellzahl/cm² nach Methode V1 und V2 und deren Standardabweichung (n=5)

V1-Methode Pipettiert	$5,1 \cdot 10^6$ $\pm 1,9 \cdot 10^6$
V2-Methode Benetzt	$3,4 \cdot 10^6$ $\pm 1,5 \cdot 10^6$

5.2 Gesamtzellzahl/cm²

Die unter dem Punkt 4.2. zusammengefassten Abbildungen zeigen die logarithmische Darstellung der Ergebnisse der Gesamtzellzahl (Biomasse) der einzelnen Proben im Vergleich zur unbehandelten Referenzprobe. In den Diagrammen ist die Inkubationszeit gegen die Anzahl der gezählten Zellen von *Asp. versicolor* aufgetragen.

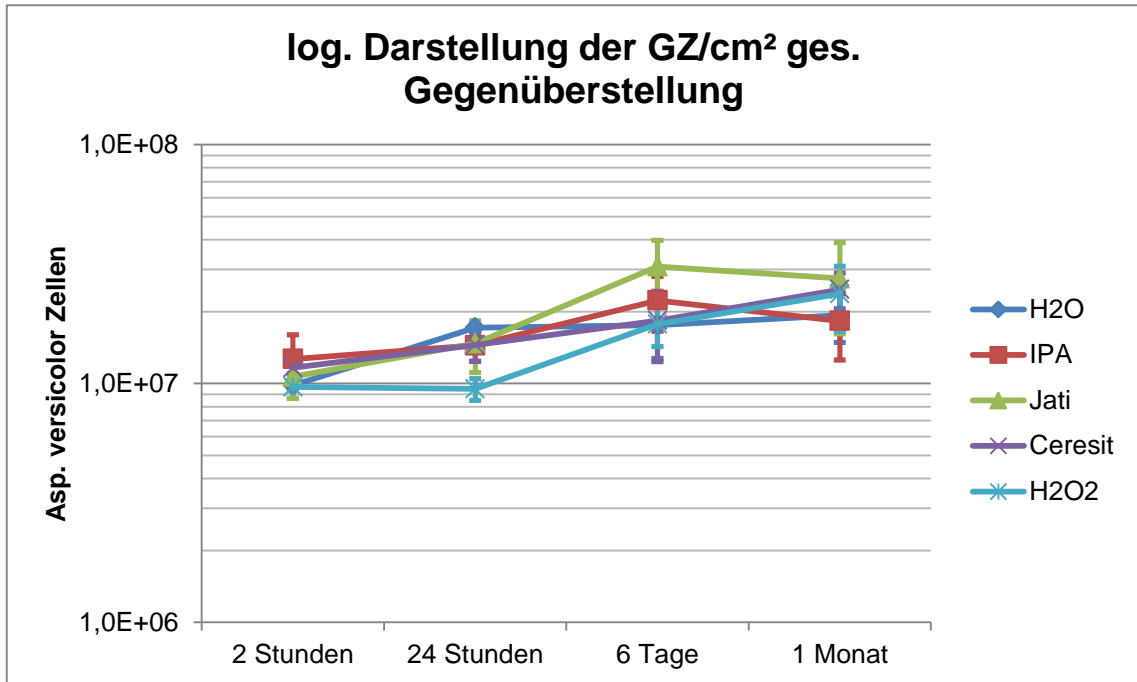


Abb. 4 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der Gesamtzellzahl/cm² von *Aspergillus versicolor* dest. H₂O, IPA, Jati, Ceresit und H₂O₂ über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 4 GZ/cm² Gesamtgegenüberstellung Ergebnisse und Standardabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	9,8*10 ⁶ ± 1,2*10 ⁶	1,7*10 ⁷ ± 8,3*10 ⁵	1,8*10 ⁷ ± 4,8*10 ⁶	1,9*10 ⁷ ± 4,4*10 ⁶
IPA (70%)	1,3*10 ⁷ ± 3,3*10 ⁶	1,4*10 ⁷ ± 2,1*10 ⁶	2,2*10 ⁷ ± 5,7*10 ⁶	1,8*10 ⁷ ± 5,8*10 ⁶
Jati-Schimmelentferner	1,1*10 ⁷ ± 2,0*10 ⁶	1,5*10 ⁷ ± 3,6*10 ⁶	3,1*10 ⁷ ± 8,9*10 ⁶	2,8*10 ⁷ ± 1,1*10 ⁷
Ceresit-Anit-Schimmel	1,2*10 ⁷ ± 1,7*10 ⁶	1,5*10 ⁷ ± 2,1*10 ⁶	1,8*10 ⁷ ± 6,0*10 ⁶	2,5*10 ⁷ ± 4,2*10 ⁶
H ₂ O ₂ (12%)	9,7*10 ⁶ ± 3,1*10 ⁵	9,5*10 ⁶ ± 1,0*10 ⁶	1,8*10 ⁷ ± 3,5*10 ⁶	2,4*10 ⁷ ± 7,2*10 ⁶

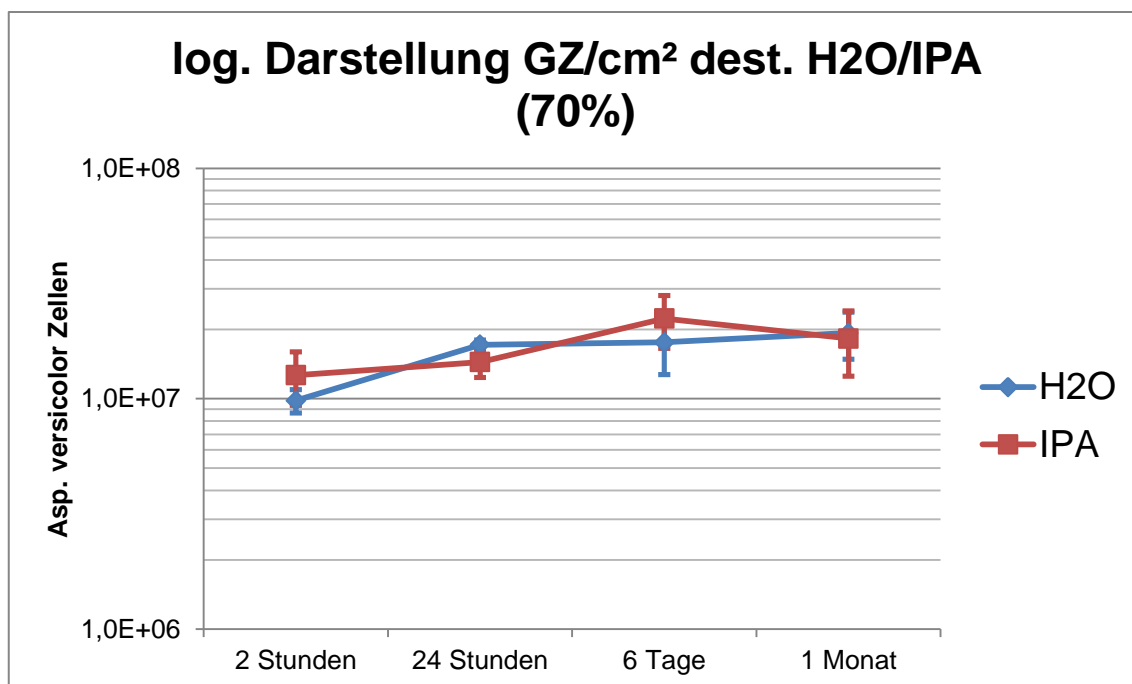


Abb. 5 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der Gesamtzellzahl von *Aspergillus versicolor* dest.H₂O und IPA, über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 5 GZ/cm² dest. H₂O/IPA (70%) Ergebnisse und Standardabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	9,8*10 ⁶ ± 1,2*10 ⁶	1,7*10 ⁷ ± 8,3*10 ⁵	1,8*10 ⁷ ± 4,8*10 ⁶	1,9*10 ⁷ ± 4,4*10 ⁶
IPA (70%)	1,3*10 ⁷ ±3,3*10 ⁶	1,4*10 ⁷ ± 2,1*10 ⁶	2,2*10 ⁷ ± 5,7*10 ⁶	1,8*10 ⁷ ± 5,8*10 ⁶

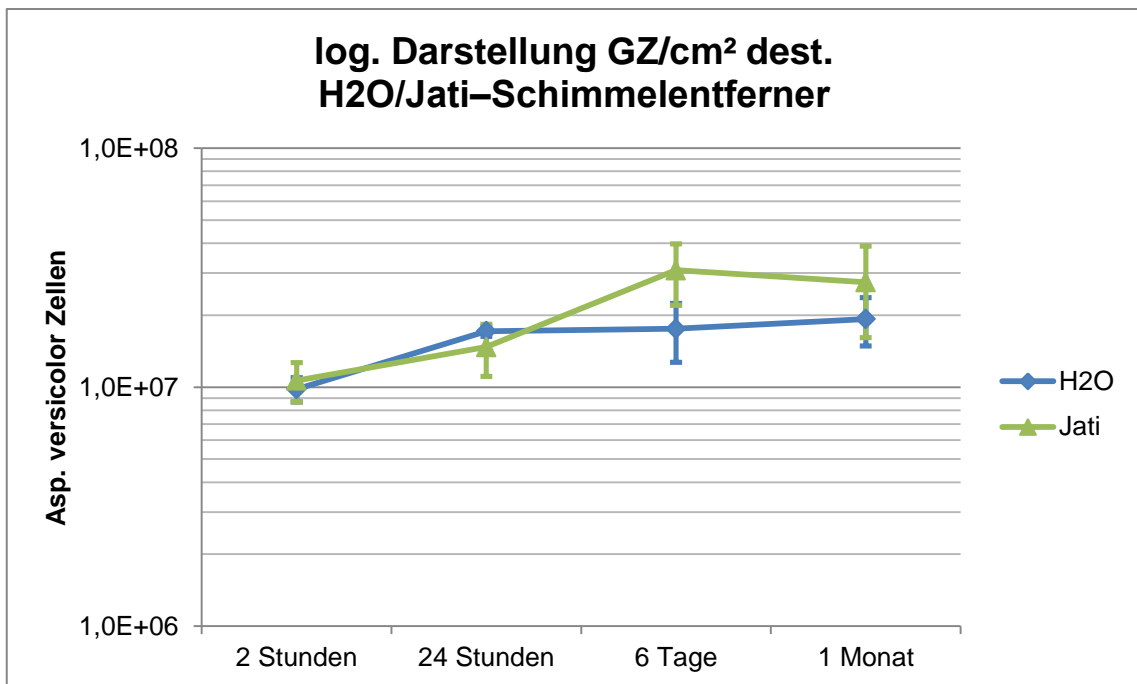


Abb. 6 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der Gesamtzellzahl/cm² von *Aspergillus versicolor* dest. H₂O und Jati-Schimmelentferner über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 6 GZ/cm² dest. H₂O/Jati-Schimmelentferner Ergebnisse und Standartabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	9,8*10 ⁶ ± 1,2*10 ⁶	1,7*10 ⁷ ± 8,3*10 ⁵	1,8*10 ⁷ ± 4,8*10 ⁶	1,9*10 ⁷ ± 4,4*10 ⁶
Jati-Schimmelentferner	1,1*10 ⁷ ± 2,0*10 ⁶	1,5*10 ⁷ ± 3,6*10 ⁶	3,1*10 ⁷ ± 8,9*10 ⁶	2,8*10 ⁷ ± 1,1*10 ⁷

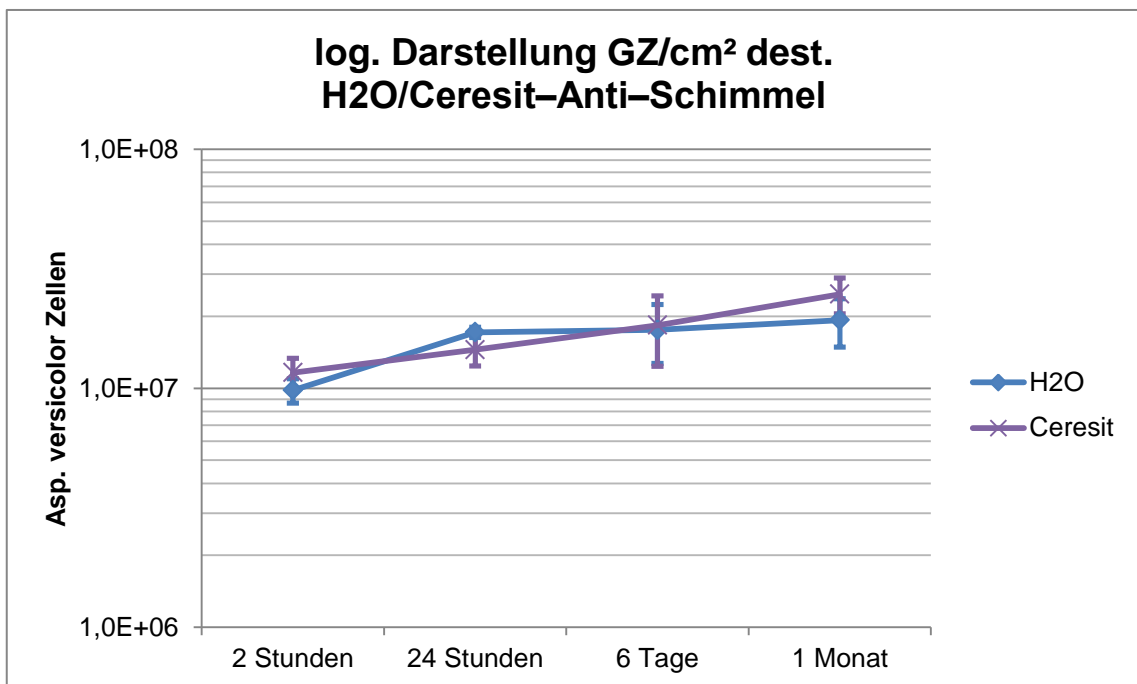


Abb. 7 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der Gesamtzellzahl/cm² von Aspergillus versicolor dest. H₂O und Ceresit–Anti–Schimmel über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 7 GZ/cm² dest. H₂O/Ceresit–Anti–Schimmel Ergebnisse und Standardabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	9,8*10 ⁶ ± 1,2*10 ⁶	1,7*10 ⁷ ± 8,3*10 ⁵	1,8*10 ⁷ ± 4,8*10 ⁶	1,9*10 ⁷ ± 4,4*10 ⁶
Ceresit–Anti–Schimmel	1,2*10 ⁷ ± 1,7*10 ⁶	1,5*10 ⁷ ± 2,1*10 ⁶	1,8*10 ⁷ ± 6,0*10 ⁶	2,5*10 ⁷ ± 4,2*10 ⁶

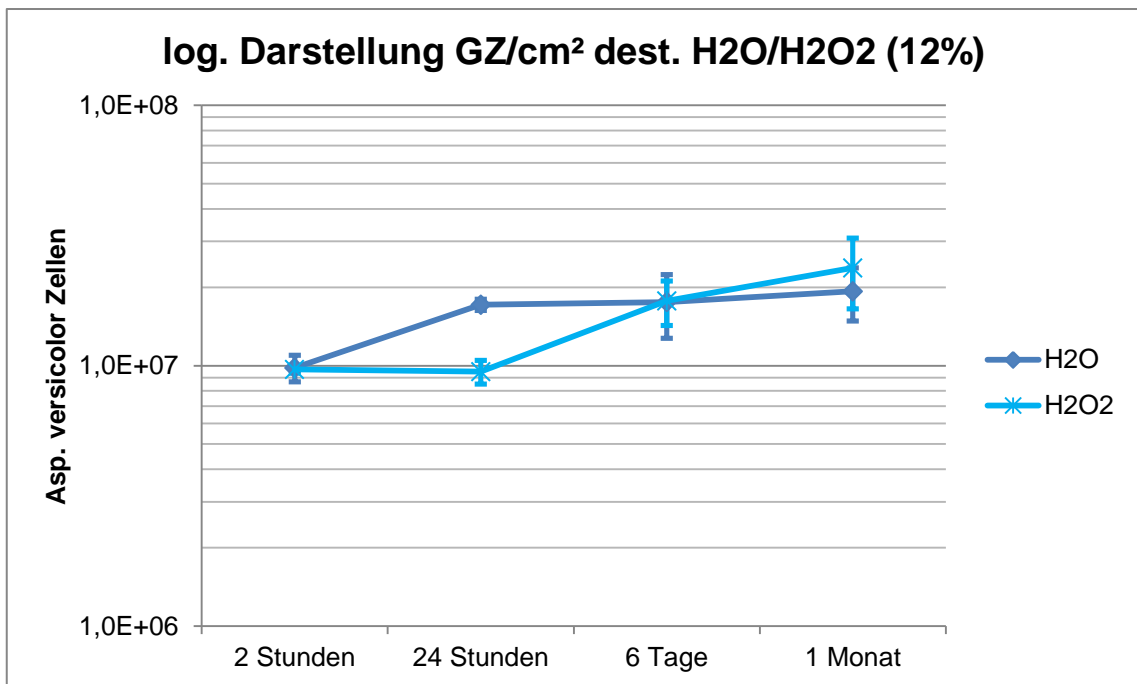


Abb. 8 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der Gesamtzellzahl/cm² von *Aspergillus versicolor* dest. H₂O und H₂O₂ (12%) über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 8 GZ dest. H₂O/H₂O₂ (12%) Ergebnisse und Standardabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	9,8*10 ⁶ ± 1,2*10 ⁶	1,7*10 ⁷ ± 8,3*10 ⁵	1,8*10 ⁷ ± 4,8*10 ⁶	1,9*10 ⁷ ± 4,4*10 ⁶
H ₂ O ₂ (12%)	9,7*10 ⁶ ± 3,1*10 ⁵	9,5*10 ⁶ ± 1,0*10 ⁶	1,8*10 ⁷ ± 3,5*10 ⁶	2,4*10 ⁷ ± 7,2*10 ⁶

5.3 Biochemische Aktivität/cm²

Die unter dem Punkt 4.3. zusammengefassten Abbildungen zeigen die logarithmische Darstellung der Ergebnisse der biochemischen Aktivität der einzelnen Proben im Vergleich zur der Referenzprobe. In den Diagrammen sind die Inkubationszeit gegen die Zellzahl *Asp. versicolor* aufgetragen.

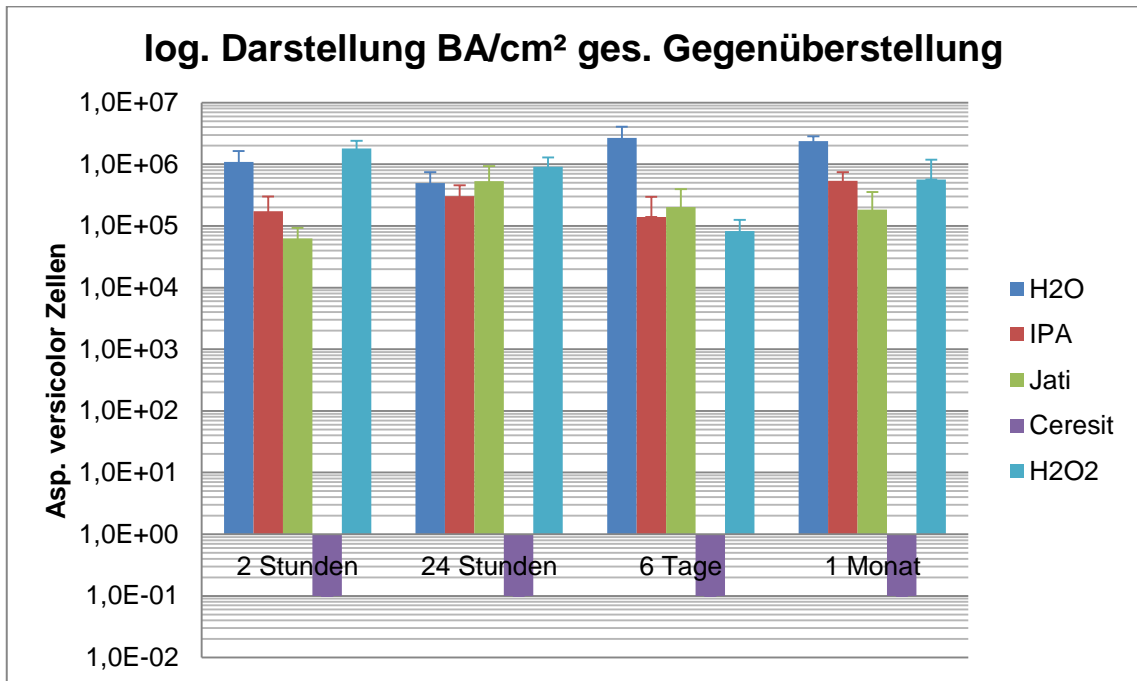


Abb. 9 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der biochemischen Aktivitäten/cm² von *Aspergillus versicolor* dest. H₂O, IPA (70%), Jati-Schimmelentferner, Ceresit-Anti-Schimmel und H₂O₂ (12%) über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 9 BA gesamt Gegenüberstellung Ergebnisse und Standardabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	1,1*10 ⁶ ± 5,5*10 ⁵	5,0*10 ⁵ ± 2,5*10 ⁵	2,7*10 ⁶ ± 1,4*10 ⁶	2,4*10 ⁶ ± 4,7*10 ⁵
IPA (70%)	1,7*10 ⁵ ± 1,2*10 ⁵	3,0*10 ⁵ ± 1,5*10 ⁵	1,4*10 ⁵ ± 1,6*10 ⁵	5,4*10 ⁵ ± 2,0*10 ⁵
Jati-Schimmelentferner	6,3*10 ⁴ ± 3,0*10 ⁴	5,4*10 ⁵ ± 4,0*10 ⁵	2,0*10 ⁵ ± 1,9*10 ⁵	1,8*10 ⁵ ± 1,7*10 ⁵
Ceresit-Anti-Schimmel	< 1	< 1	< 1	< 1
H ₂ O ₂ (12%)	1,8*10 ⁶ ± 5,9*10 ⁵	9,2*10 ⁵ ± 3,8*10 ⁵	8,3*10 ⁴ ± 4,3*10 ⁴	5,7*10 ⁵ ± 6,3*10 ⁵

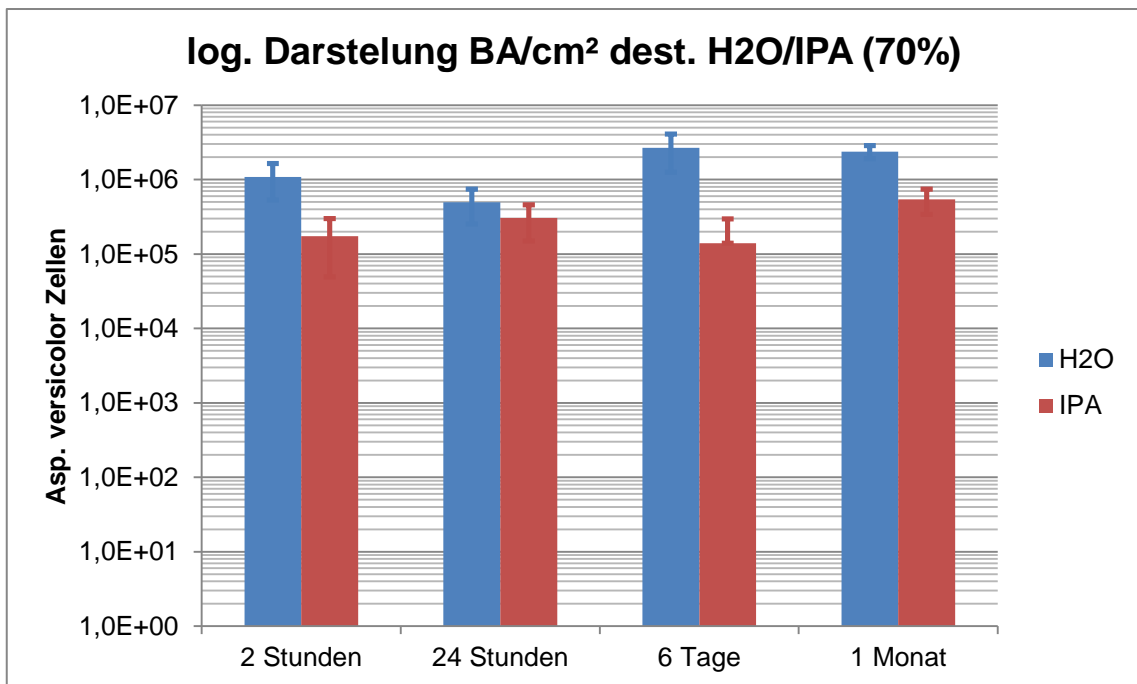


Abb. 10 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der biochemischen Aktivitäten/cm² von *Aspergillus versicolor* dest. H₂O und IPA über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 10 BA/cm² dest. H₂O/IPA (70%) Ergebnisse und Standartabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	1,1*10 ⁶ ± 5,5*10 ⁵	5,0*10 ⁵ ± 2,5*10 ⁵	2,7*10 ⁶ ± 1,4*10 ⁶	2,4*10 ⁶ ± 4,7*10 ⁵
IPA (70%)	1,7*10 ⁵ ± 1,2*10 ⁵	3,0*10 ⁵ ± 1,5*10 ⁵	1,4*10 ⁵ ± 1,6*10 ⁵	5,4*10 ⁵ ± 2,0*10 ⁵

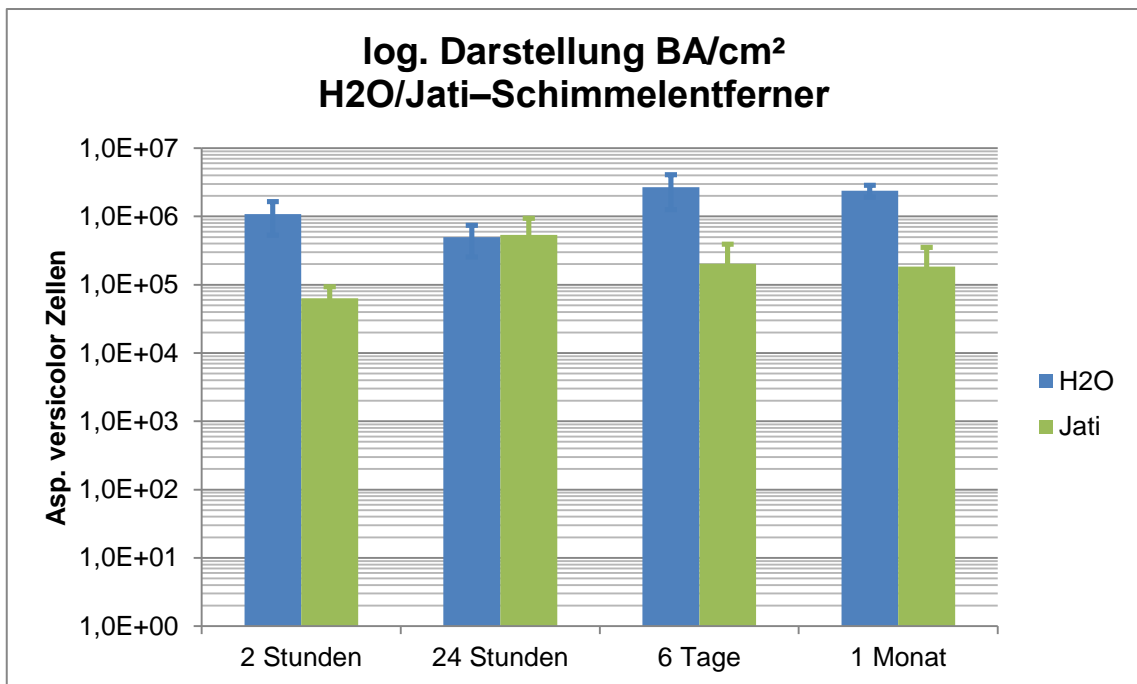


Abb. 11 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der biochemischen Aktivitäten/cm² von *Aspergillus versicolor* dest. H₂O und Jati-Schimmelentferner über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 11 BA/cm² dest. H₂O/Jati-Schimmelentferner Ergebnisse und Standardabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	1,1*10 ⁶ ± 5,5*10 ⁵	5,0*10 ⁵ ± 2,5*10 ⁵	2,7*10 ⁶ ± 1,4*10 ⁶	2,4*10 ⁶ ± 4,7*10 ⁵
Jati-Schimmelentferner	6,3*10 ⁴ ± 3,0*10 ⁴	5,4*10 ⁵ ± 4,0*10 ⁵	2,0*10 ⁵ ± 1,9*10 ⁵	1,8*10 ⁵ ± 1,7*10 ⁵

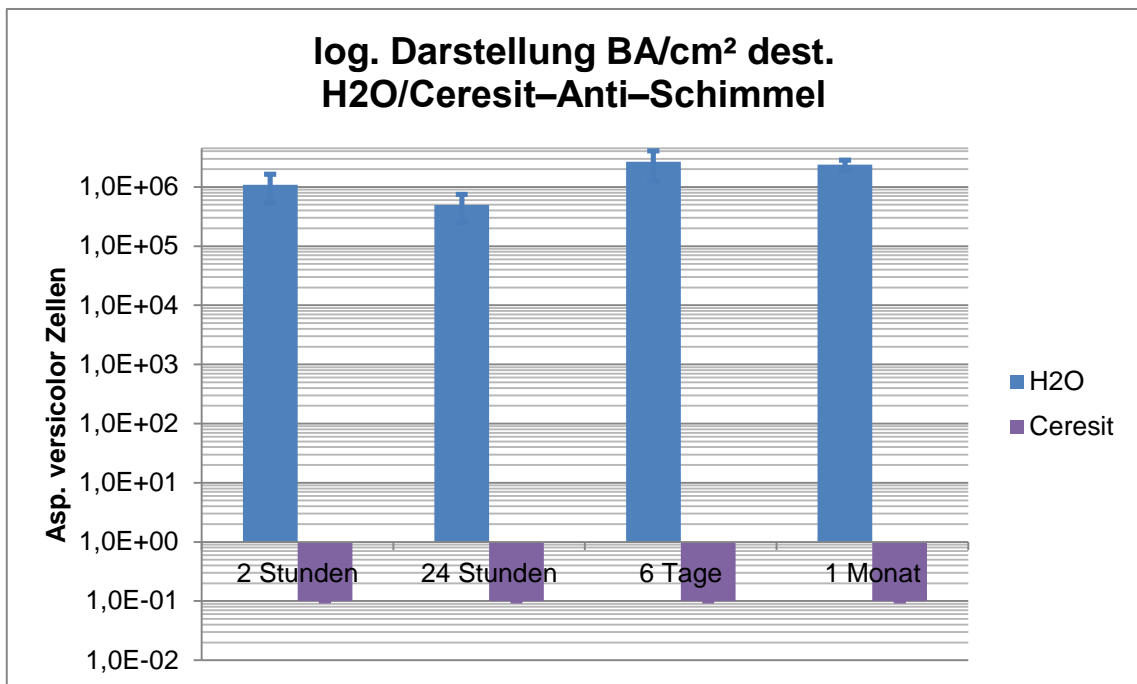


Abb. 12 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der biochemischen Aktivitäten/cm² von *Aspergillus versicolor* dest. H₂O und Ceresit–Anti–Schimmel über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 12 BA/cm² dest. H₂O/Ceresit–Anti–Schimmel Ergebnisse und Standardabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	1,1*10 ⁶ ± 5,5*10 ⁵	5,0*10 ⁵ ± 2,5*10 ⁵	2,7*10 ⁶ ± 1,4*10 ⁶	2,4*10 ⁶ ± 4,7*10 ⁵
Ceresit–Anti–Schimmel	< 1	< 1	< 1	< 1

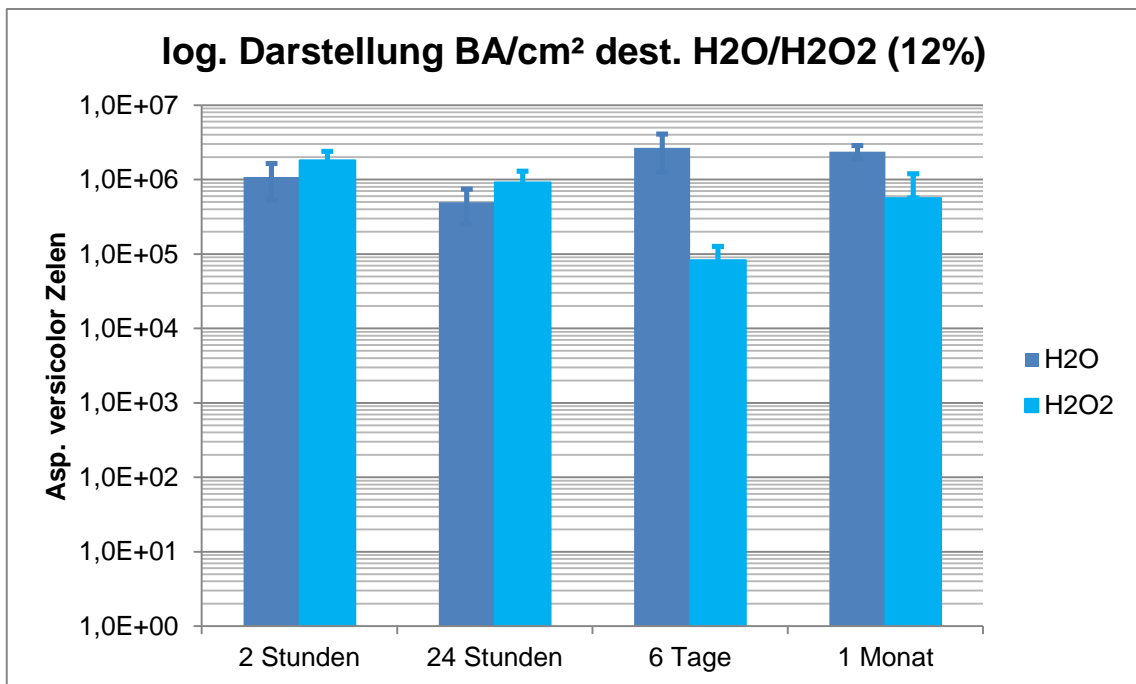


Abb. 13 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der biochemischen Aktivitäten/cm² von *Aspergillus versicolor* dest. H₂O und H₂O₂ (12%) über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 13 BA/cm² dest. H₂O/H₂O₂ (12%) Ergebnisse und Standardabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	1,1*10 ⁶ ± 5,5*10 ⁵	5,0*10 ⁵ ± 2,5*10 ⁵	2,7*10 ⁶ ± 1,4*10 ⁶	2,4*10 ⁶ ± 4,7*10 ⁵
H ₂ O ₂ (12%)	1,8*10 ⁶ ± 5,9*10 ⁵	9,2*10 ⁵ ± 3,8*10 ⁵	8,3*10 ⁴ ± 4,3*10 ⁴	5,7*10 ⁵ ± 6,3*10 ⁵

5.4 Koloniebildende Einheiten/cm²

Die unter dem Punkt 4.4. zusammengefassten Abbildungen zeigen die logarithmische Darstellung der Ergebnisse der Koloniebildenden Einheiten der einzelnen Proben im Vergleich zur der Referenzprobe. In den Diagrammen sind die Inkubationszeit gegen die Zellzahl *Asp. versicolor* aufgetragen.

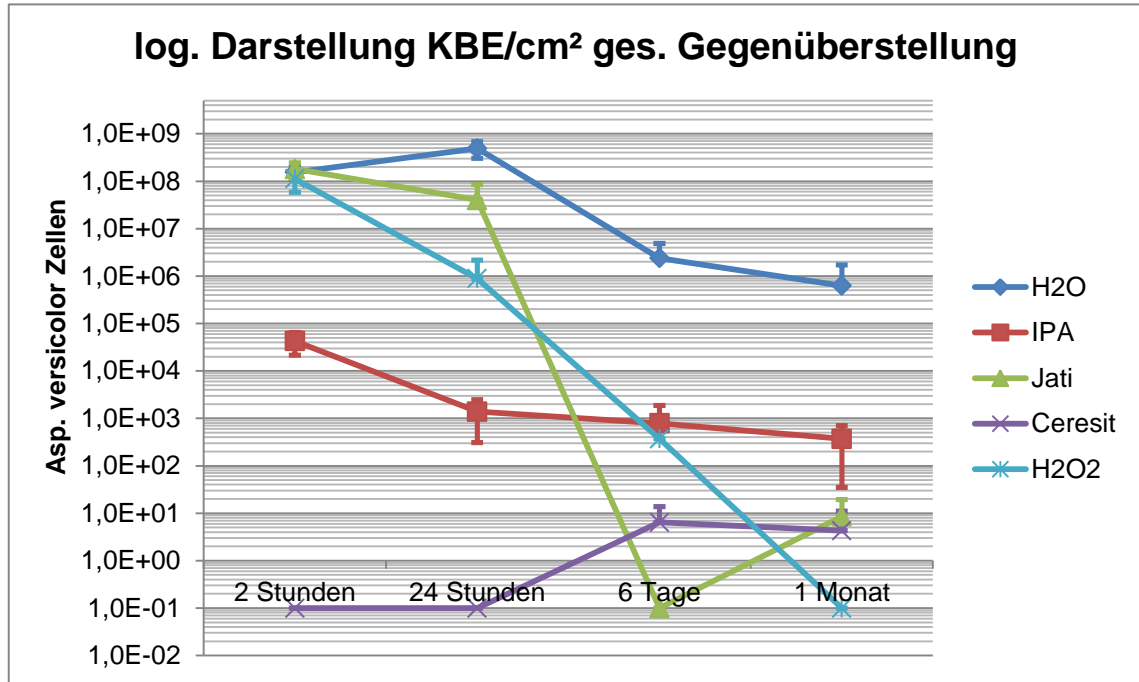


Abb. 14 Gegenüberstellung aller Mittelwerte der Koloniebildenden Einheiten/cm² von *Aspergillus versicolor* dest. H₂O, IPA (70%), Jati-Schimmelentferner, Ceresit-Anti-Schimmel und H₂O₂ (12%) über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 14 KBE/cm² gesamt Gegenüberstellung Ergebnisse und Standardabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	1,5*10 ⁸ ± 4,3*10 ⁷	4,9*10 ⁸ ± 1,9*10 ⁸	2,4*10 ⁶ ± 2,5*10 ⁶	6,3*10 ⁵ ± 1,1*10 ⁶
IPA (70%)	4,3*10 ⁴ ±2,1*10 ⁴	1,4*10 ³ ± 1,1*10 ³	7,9*10 ² ±1,1*10 ³	3,7*10 ² ± 3,4*10 ²
Jati-Schimmelentferner	1,8*10 ⁸ ± 6,5*10 ⁷	4,0*10 ⁷ ± 4,5*10 ⁷	< 1	8,6 ± 1,1*10 ¹
Ceresit-Anti-Schimmel	< 1	< 1	6,4*10 ¹ ± 7,4*10 ¹	4,3*10 ¹ ± 6,8*10 ¹
H ₂ O ₂ (12%)	1,1*10 ⁸ ± 5,4*10 ⁷	8,9*10 ⁵ ± 1,3*10 ⁶	3,7*10 ² ± 5,7*10 ²	< 1

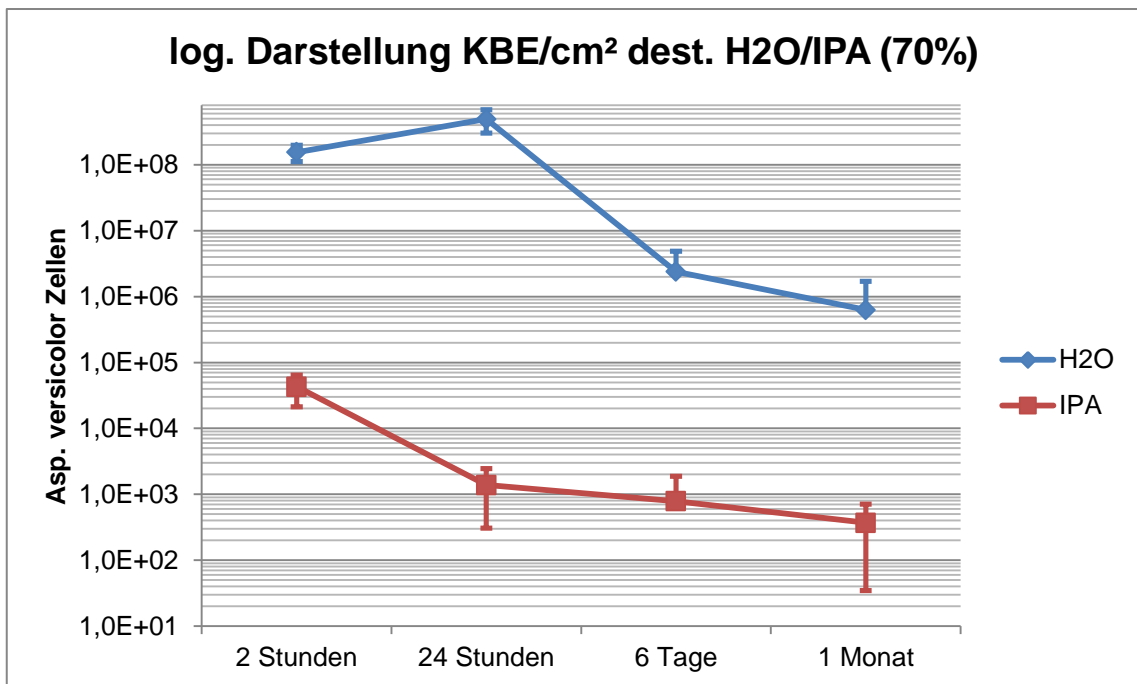


Abb. 15 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der Koloniebildenden Einheiten/cm² von *Aspergillus versicolor* dest. H₂O und IPA (70%) über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 15 KBE/cm² dest. H₂O/IPA (70%) Ergebnisse und Standardabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	1,5*10 ⁸ ± 4,3*10 ⁷	4,9*10 ⁸ ± 1,9*10 ⁸	2,4*10 ⁶ ± 2,5*10 ⁶	6,3*10 ⁵ ± 1,1*10 ⁶
IPA (70%)	4,3*10 ⁴ ± 2,1*10 ⁴	1,4*10 ³ ± 1,1*10 ³	7,9*10 ² ± 1,1*10 ³	3,7*10 ² ± 3,4*10 ²

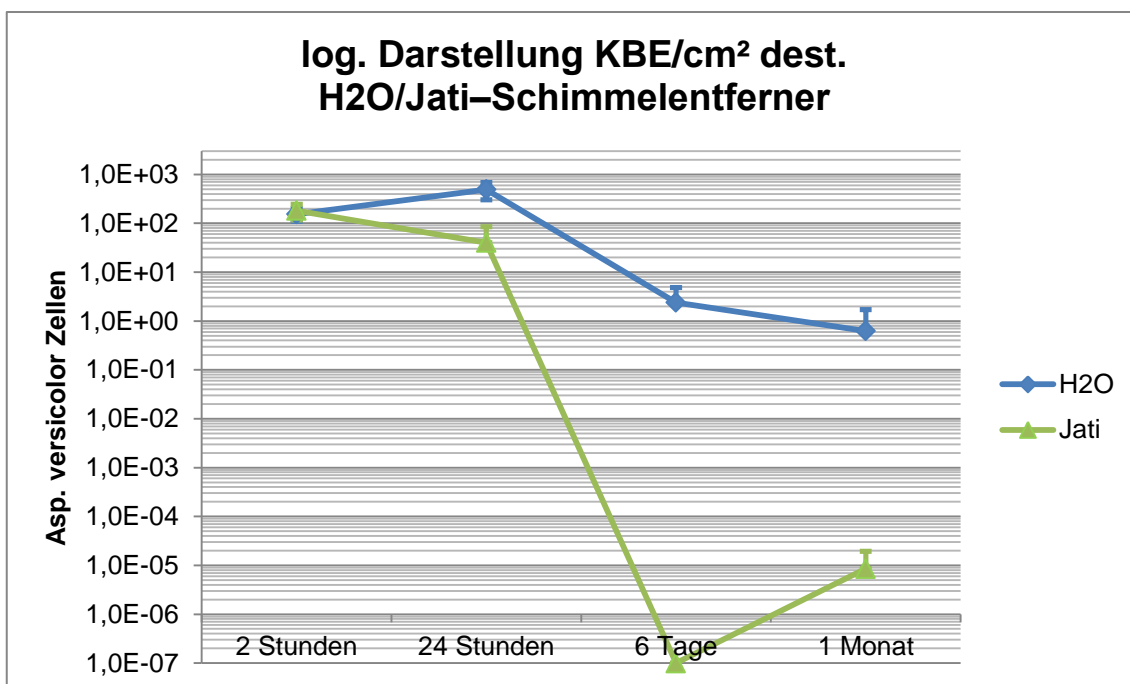


Abb. 16 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der Koloniebildenden Einheiten/cm² von *Aspergillus versicolor* dest. H₂O und Jati-Schimmelentferner über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 16 KBE/cm² dest. H₂O/Jati-Schimmelentferner Ergebnisse und Standardabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	1,5*10 ⁸ ± 4,3*10 ⁷	4,9*10 ⁸ ± 1,9*10 ⁸	2,4*10 ⁶ ± 2,5*10 ⁶	6,3*10 ⁵ ± 1,1*10 ⁶
Jati-Schimmelentferner	1,8*10 ⁸ ± 6,5*10 ⁷	4,0*10 ⁷ ± 4,5*10 ⁷	< 1	8,6 ± 1,1*10 ¹

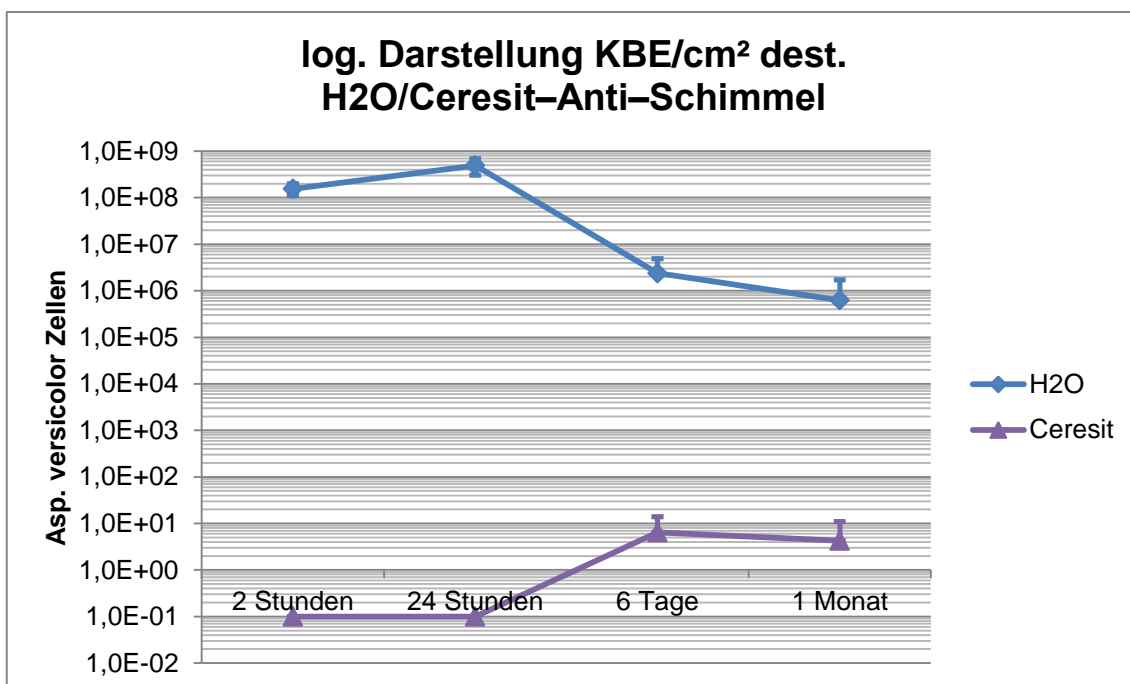


Abb. 17 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der Koloniebildenden Einheiten/cm² von Aspergillus versicolor dest. H₂O und Ceresit–Anti–Schimmel über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 17 KBE/cm² dest. H₂O/Ceresit–Anti–Schimmel Ergebnisse und Standartabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	$1,5 \cdot 10^8$ $\pm 4,3 \cdot 10^7$	$4,9 \cdot 10^8$ $\pm 1,9 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^6$ $\pm 2,5 \cdot 10^6$	$6,3 \cdot 10^5$ $\pm 1,1 \cdot 10^6$
Ceresit–Anti–Schimmel	< 1	< 1	$6,4 \cdot 10^1$ $\pm 7,4 \cdot 10^1$	$4,3 \cdot 10^1$ $\pm 6,8 \cdot 10^1$

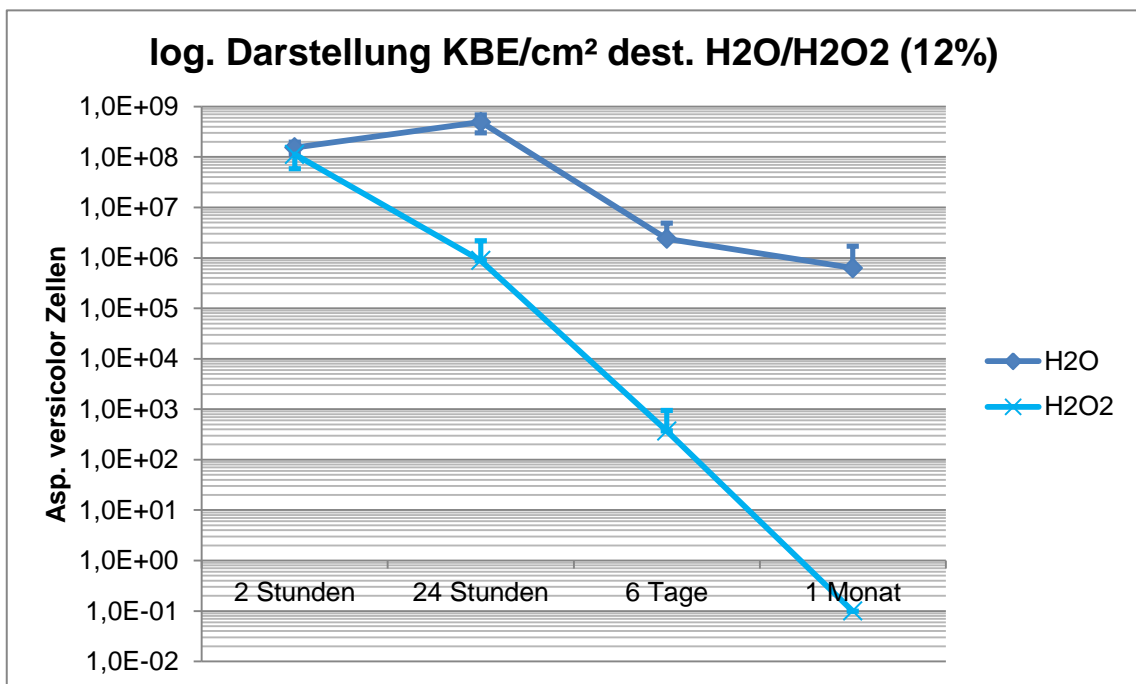


Abb. 18 Logarithmische Darstellung aller Mittelwerte der Koloniebildenden Einheiten/cm² von *Aspergillus versicolor* dest. H₂O und H₂O₂ (12%) über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 18 KBE/cm² dest. H₂O/H₂O₂ Ergebnisse und Standardabweichung (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
dest. H ₂ O	1,5·10 ⁸ ± 4,3·10 ⁷	4,9·10 ⁸ ± 1,9·10 ⁸	2,4·10 ⁶ ± 2,5·10 ⁶	6,3·10 ⁵ ± 1,1·10 ⁶
H ₂ O ₂ (12%)	1,1·10 ⁸ ± 5,4·10 ⁷	8,9·10 ⁵ ± 1,3·10 ⁶	3,7·10 ² ± 5,7·10 ²	< 1

5.5 Gegenüberstellung der GZ/cm², BA/cm² und KBE/cm² Werte der Referenzsubstanz und der antimikrobiell wirkenden Substanzen

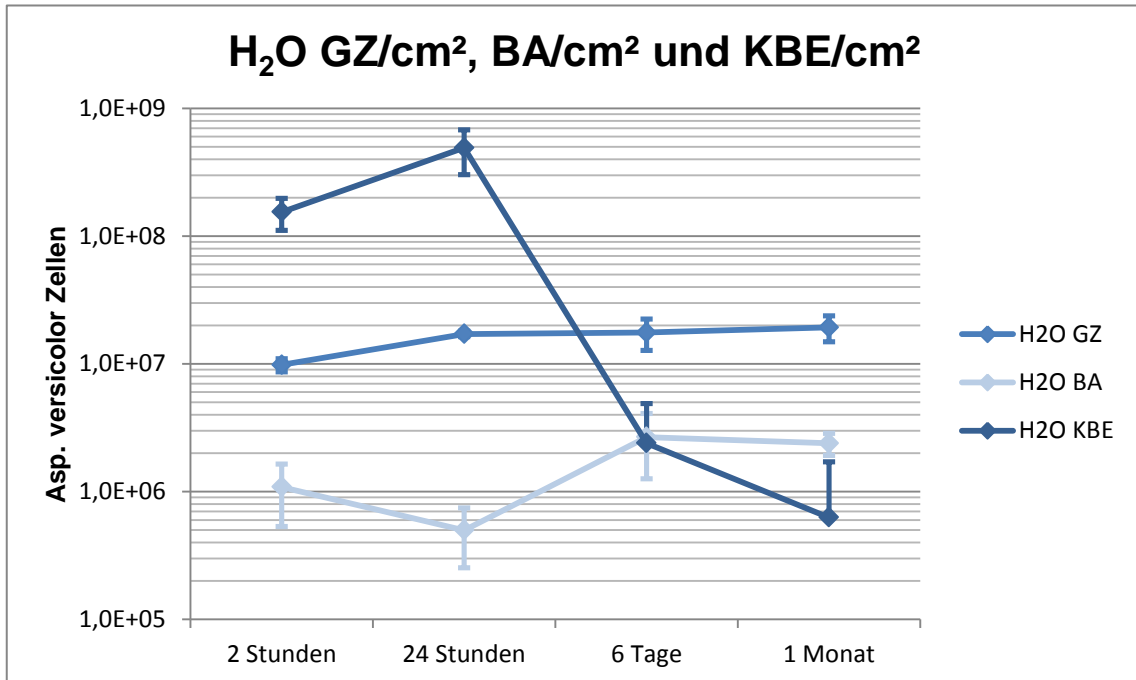


Abb.19 Logarithmische Darstellung aller dest H₂O Mittelwerte der Gesamtzellzahl/cm², biologischen Aktivität/cm² und der Koloniebildenden Einheiten/cm² von *Aspergillus versicolor* über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 19 dest. H₂O Ergebnisse und Standardabweichung der GZ/cm², BA/cm² und KBE/cm² (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
GZ/cm ²	9,8*10 ⁶ ± 1,2*10 ⁶	1,7*10 ⁷ ± 8,3*10 ⁵	1,8*10 ⁷ ± 4,8*10 ⁶	1,9*10 ⁷ ± 4,4*10 ⁶
BA/cm ²	1,1*10 ⁶ ± 5,5*10 ⁵	5,0*10 ⁵ ± 2,5*10 ⁵	2,7*10 ⁶ ± 1,4*10 ⁶	2,4*10 ⁶ ± 4,7*10 ⁵
KBE/cm ²	1,5*10 ⁸ ± 4,3*10 ⁷	4,9*10 ⁸ ± 1,9*10 ⁸	2,4*10 ⁶ ± 2,5*10 ⁶	6,3*10 ⁵ ± 1,1*10 ⁶

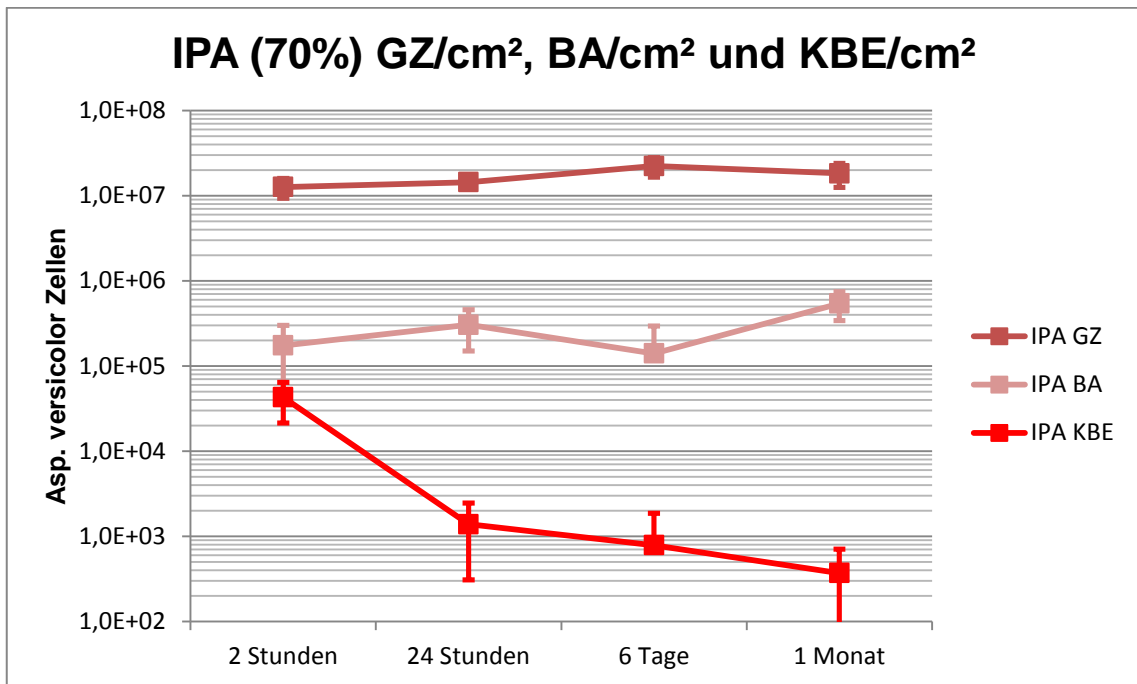


Abb.20 Logarithmische Darstellung aller IPA (70%) Mittelwerte der Gesamtzellzahl/cm², biologischen Aktivität/cm² und der Koloniebildenden Einheiten/cm² von Aspergillus versicolor über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 20 IPA (70%) Ergebnisse und Standardabweichung der GZ/cm², BA/cm² und KBE/cm² (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
GZ/cm ²	$1,3 \cdot 10^7$ $\pm 3,3 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^7$ $\pm 2,1 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^7$ $\pm 5,7 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^7$ $\pm 5,8 \cdot 10^6$
BA/cm ²	$1,7 \cdot 10^5$ $\pm 1,2 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$ $\pm 1,5 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$ $\pm 1,6 \cdot 10^5$	$5,4 \cdot 10^5$ $\pm 2,0 \cdot 10^5$
KBE/cm ²	$4,3 \cdot 10^4$ $\pm 2,1 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^3$ $\pm 1,1 \cdot 10^3$	$7,9 \cdot 10^2$ $\pm 1,1 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^2$ $\pm 3,4 \cdot 10^2$

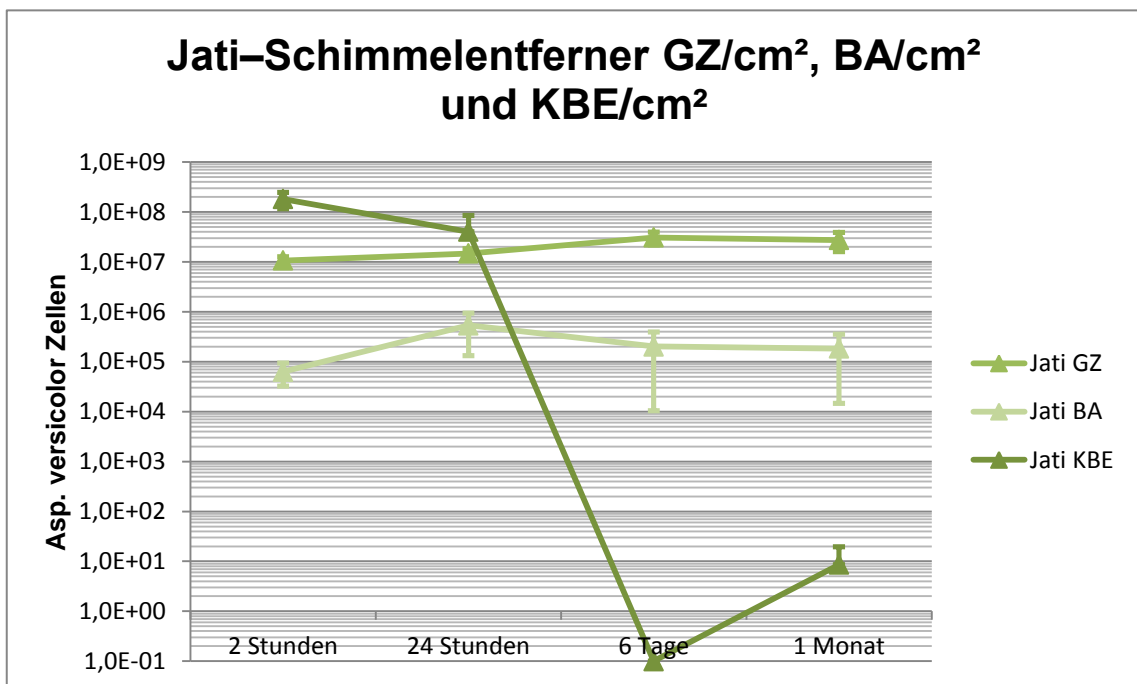


Abb.21 Logarithmische Darstellung aller Jati-Schimmelentferner Mittelwerte der Gesamtzellzahl/cm², biologischen Aktivität/cm² und der Koloniebildenden Einheiten/cm² von *Aspergillus versicolor* über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab.21 Jati-Schimmelentferner Ergebnisse und Standardabweichung der GZ/cm², BA/cm² und KBE/cm² (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
GZ/cm ²	1,1*10 ⁷ ± 2,0*10 ⁶	1,5*10 ⁷ ± 3,6*10 ⁶	3,1*10 ⁷ ± 8,9*10 ⁶	2,8*10 ⁷ ± 1,1*10 ⁷
BA/cm ²	6,3*10 ⁴ ± 3,0*10 ⁴	5,4*10 ⁵ ± 4,0*10 ⁵	2,0*10 ⁵ ± 1,9*10 ⁵	1,8*10 ⁵ ± 1,7*10 ⁵
KBE/cm ²	1,8*10 ⁸ ± 6,5*10 ⁷	4,0*10 ⁷ ± 4,5*10 ⁷	< 1	8,6 ± 1,1*10 ¹

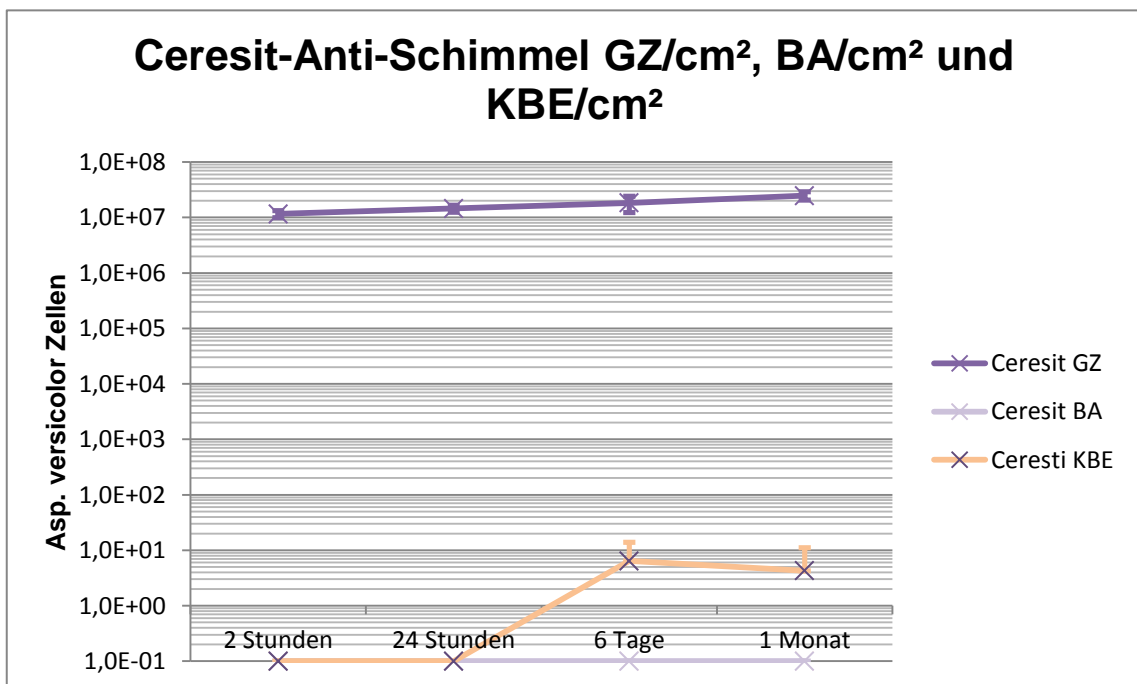


Abb. 22 Logarithmische Darstellung aller Ceresit–Anti–Schimmel Mittelwerte der Gesamtzellzahl/cm², biologischen Aktivität/cm² und der Koloniebildenden Einheiten/cm² von Aspergillus versicolor über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab.22 Ceresit–Anti–Schimmel Ergebnisse und Standartabweichung der GZ/cm², BA/cm² und KBE/cm² (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
GZ/cm ²	1,2*10 ⁷ ± 1,7*10 ⁶	1,5*10 ⁷ ± 2,1*10 ⁶	1,8*10 ⁷ ± 6,0*10 ⁶	2,5*10 ⁷ ± 4,2*10 ⁶
BA/cm ²	< 1	< 1	< 1	< 1
KBE/cm ²	< 1	< 1	6,4*10 ¹ ± 7,4*10 ¹	4,3*10 ¹ ± 6,8*10 ¹

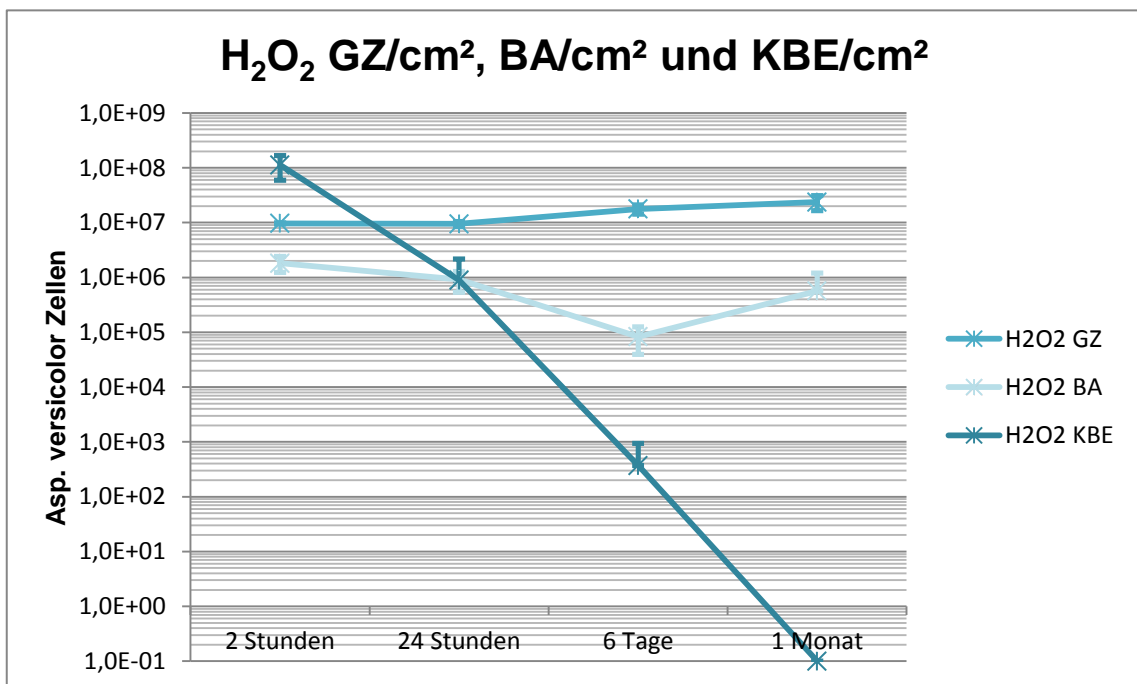


Abb.23 Logarithmische Darstellung aller H₂O₂ Mittelwerte der Gesamtzellzahl/cm², biologischen Aktivität/cm² und der Koloniebildenden Einheiten/cm² von *Aspergillus versicolor* über den gesamten Zeitraum des Versuchs nach den Inkubationszeiten

Tab. 23 H₂O₂ (12%) Ergebnisse und Standardabweichung der GZ/cm², BA/cm² und KBE/cm² (n=8)

	2 Stunden	24 Stunden	6 Tage	1 Monat
GZ/cm ²	9,7*10 ⁶ ± 3,1*10 ⁵	9,5*10 ⁶ ± 1,0*10 ⁶	1,8*10 ⁷ ± 3,5*10 ⁶	2,4*10 ⁷ ± 7,2*10 ⁶
BA/cm ²	1,8*10 ⁶ ± 5,9*10 ⁵	9,2*10 ⁵ ± 3,8*10 ⁵	8,3*10 ⁴ ± 4,3*10 ⁴	5,7*10 ⁵ ± 6,3*10 ⁵
KBE/cm ²	1,1*10 ⁸ ± 5,4*10 ⁷	8,9*10 ⁵ ± 1,3*10 ⁶	3,7*10 ² ± 5,7*10 ²	< 1

6 Diskussion

Beschickung der Tapete mit *Aspergillus versicolor*

Um homogen kontaminierte Tapetenstücke erzeugen zu können, wurden zwei Methoden (Methoden-V1 (pipettieren) und Methode-V2 (benetzen)) zum Beschicken der Tapete mit *Asp. versicolor* Sporen und Myzel mit einander verglichen.

Bei Methode-V1 (pipettieren) wurden 300 µl der wie unter 3.2. beschrieben hergestellten Suspension direkt, mittig auf die Tapete pipettiert. Die Suspension zog nicht sofort in das Papier ein, sondern verblieb einige Minuten als Tropfen auf der Papieroberfläche. Das führte häufig dazu, dass der Tropfen direkt von dem Papier runter, in den Agar lief. Um das zu verhindern durfte der Nährboden für 10–20 Minuten nicht bewegt werden. Darüber hinaus war Methode-V1 zeitaufwendiger, und anfälliger für Fehler.

Bei Methode-V2 (benetzen) (Abb. 1) wurden 1ml der wie unter 3.2. beschrieben hergestellten Suspension in ein geeignetes, zuvor desinfiziertes Gefäß pipettiert. Mit einer sterilisierten Pinzette wurde die obere Seite der Tapete in die Suspension gehalten, so dass sie vollständig benetzt war. Danach wurde das Tapetenstück mit der benetzten Seite nach oben auf den Nährboden gelegt. Die Methode war schnell und unkompliziert. Nach dem Benetzen der Proben blieb eine adäquate Menge der Suspension zurück. Die Summe der Gesamtzellzahl zeigt, dass die nach Methode-V2 beschickten Tapetenstücke 42% mehr Zellen enthielt als die Proben die nach Methode-V1 (pipettieren) benetzten Tapetenstücke. Die Standardabweichung von V2 (benetzen) betrug $\pm 1,5 \cdot 10^6$ Zellen und war etwas geringer, als die der Methode-V1 $\pm 1,9 \cdot 10^6$.

Theoretisch eignen sich beide Methoden dafür homogen kontaminiertes Probenmaterial herzustellen. Methode-V2 (benetzen) wurde zum Beschicken der Tapete gewählt, weil auf dem Tapetenstück mehr Zellen nachgewiesen werden konnten und darüber hinaus schneller und weniger fehleranfällig war, als Methode-V1 (pipettieren).

Die beimpften Tapetenstücke (im Folgenden auch Proben genannt) wurden nach 10 Tagen vom Agar gelöst, mit der vorgesehenen Chemikalie besprüht, in eine leere Petrischale gelegt und entsprechend der Inkubationszeiten dort belassen. Als Referenzsubstanz wurde dest. Wasser gewählt. Obwohl der Großteil der Tapete makroskopisch gleichmäßig völlig überwuchert war (Abb. 2), waren nicht alle gleich gut bewachsen. Ein paar der Proben zeigten unbewachsene Bereiche. Der Grund hierfür ist unklar. Eventuell hat sich bei der Beschickung ein dünner Luftfilm zwischen den kleinen Erhöhungen der eingearbeiteten Holzsplitter gebildet. Wegen der Beschaffenheit der Tapete fielen visuelle Unterschiede (dunklere Färbung des Papiers durch Befeuchtung oder Lichtreflektion durch die aufgebrauchte Feuchtigkeit auf die Oberfläche) nicht auf. Sie wurden wie die anderen Proben behandelt und in der Bewertung nicht gesondert betrachtet.

Die antimikrobiell wirkenden Substanzen wurden aus 30 cm Höhe waagrecht auf die Proben gesprüht. Damit auf jede Probe dieselbe Menge der Chemikalie gelangt, wurde mit Ausnahme des Ceresit–Anti–Schimmel (bei dem sich der Sprühkopf nicht entfernen ließ), immer derselbe Sprühkopf verwendet. Der Sprühkopf wurde bezüglich seiner Sprühmenge mit H₂O getestet. Das Auswiegen ergab, dass bei jedem Sprühen ca. 1,3 g Flüssigkeit auf die Probe gelangte. Vernachlässigt man die molare Masse der Chemikalien wurden also 1,3 g des Desinfektionsmittel auf den 2*2 cm großen Papierstücken verteilt. Ein entsprechender Vergleich des Sprühkopfes vom Ceresit–Anti–Schimmel zeigte, dass er eine vergleichbare Menge (1,26 g) des Wirkstoffes sprühte. Während des Sprühens war zu sehen, dass sich gewisse Mengen der Sporen durch den Aerosoldruck von der Probe lösten und in die Luft entwichen. Sie konnten so bei der Auswertung nicht erfasst werden. Es wurden nach 2, 24 Stunden, 6 Tagen und 1 Monat Inkubationszeit die Gesamtzellzahl/Biomasse pro cm² (GZ/cm²), die biochemische Aktivität pro cm² (BA/cm²) und die koloniebildenden Einheiten pro cm² (KBE/cm²) ermittelt. Bei der Zählung der GZ und BA wurden Sporen und Myzel gezählt.

Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtgegenüberstellung der Biomasse (Abb. 4) zeigt klar, dass durch keines der Mittel, bei einmaliger Dosierung der Wirkstoffe die Biomasse (GZ) vollständig abgetötet werden konnte, bzw. die Biomassenproduktion länger als 6 Tage reduziert werden konnte. Einzig durch H₂O₂ (12%) (Abb. 8) konnte in den ersten 24 Stunden ein mikrobiostatischer Effekt erzielt werden. Die GZ lag unter dem nachgewiesenen GZ-Wert der unbehandelten Referenzprobe. Nach 6 Tagen erreichten die mit H₂O₂ (12%) und Ceresit–Anti–Schimmel behandelten Proben, dessen Hauptwirkstoff Natriumhypochlorid ist (Abb. 7), wie die unbehandelte Referenzprobe, einen GZ-Wert von $1,8 \cdot 10^7$. Das Biozid Jati–Schimmelentferner (enthält u.a. H₂O₂) zeigte innerhalb der ersten 24 Stunden keinen reduzierenden Einfluss mehr und scheint das Wachstum sogar zu beschleunigen. Auch 70%–iges IPA (Abb. 6) zeigen nach 6 Tagen kaum noch einen reduzierenden Einfluss auf den Zuwachs der Biomasse. Zum einen ist hier anzuführen, dass sowohl IPA als auch H₂O₂ (Medieneffekt) flüchtige Stoffe sind. Oxidativ wirkende Stoffe wie H₂O₂ denaturieren nicht nur Proteine der Mikroorganismen, sondern reagieren auch mit den organischen Bestandteilen des Mediums (hier Tapete). Das H₂O₂ (12%) kann durch die unspezifische Reaktion zu H₂O und $\frac{1}{2}$ O₂ zerfallen und verliert so seine antimikrobielle Wirkung. Durch die Reaktion wird in der Probe zusätzliches Wasser eingebracht.

Christina Meier [13] untersuchte 2006 in Bezug auf „Papierrestauratorische Praxis“ die fungizide Wirkung von Ethanol und Isopropanol auf Schimmelpilze (darunter auch auf *Aspergillus versicolor*) auf „Ino-Shi“-Japanpapier (3*3cm). „Die Frage nach der tatsächlichen Wirksamkeit von Ethanol bzw. Isopropanol auf Papier und der effektivsten Behandlungsmethode sollte detailliert untersucht werden.“ Beim Besprühen hatte der Alkohol keine Wirkung auf die Wachstumsrate. „Das Besprühen von Papier mit Alkohol erwies sich als absolut ungeeignet“

Die Tatsache, dass IPA (70%), Ceresit–Anti–Schimmel und H₂O₂ (12%) bezüglich der Biomassenreduzierung ähnlich schlecht wirkten, kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass sie sich ähnlich schnell verflüchtigen bzw.

beim H_2O_2 (12%) der „Medieneffekt“ (Eiweißeffekt) einsetzte und die Kontaktzeit und Wirkstoffmenge nicht ausreichend war. Zudem ist die Applikation durch das Besprühen nur oberflächlich. Der Verlauf des Biomassenzuwachs (Abb. 4) zeigt, dass die mit IPA (70%), Ceresit–Anti–Schimmel und H_2O_2 (12%) behandelten Proben nach 6 Tagen einen ähnlichen Wachstumsverlauf, wie die unbehandelte H_2O Referenzprobe haben. Betrachtet man den Biomassenzuwachs in der Gesamtgegenüberstellung (Abb. 4) genauer, stellt man fest, dass Jati–Schimmelentferner im Vergleich zu den anderen antimikrobiell wirkenden Substanzen und der unbehandelten Referenz Probe bereits nach 24 h den größten Biomassenzuwachs zeigt. Da weder der Sauerstoffgehalt, noch der pH–Wert, die Feuchtigkeit oder die Temperatur verändert worden sind, wird vermutet, dass im Jati–Schimmelentferner (Abb. 6) noch eine zusätzliche Komponente enthalten sein könnte, die von *Asp. versicolor* verstoffwechselt werden kann.

Laut Herstellerangaben sind 40–50 g/l H_2O_2 und geringe Mengen an Stabilisatoren auf „Fruchtsäurebasis“ (Benzoessäure und Sorbinsäure als Konservierungsmittel) enthalten [14]. In der Literatur wird beschrieben, dass Benzoessäure und Sorbinsäure fungistatisch wirken können [12]. Fungistatisch bedeutet (Pilz) wachstumshemmend, nicht Fungizid (pilztötend), die Zellen werden demnach lediglich in ihrem Wachstum gehemmt. Benzoessäure benötigt eine Wirkstoffkonzentration von 500–1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sorbinsäure 25–500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ um fungistatisch wirksam sein zu können [12]. Laut dem Technischen Merkblatt sind „Stabilisierende Fruchtsäuren (pharmazeutische Reinheit) und sonstige Stabilisatoren < 1%“ enthalten [15]. Der genaue Anteil der Fruchtsäuren in Jati–Schimmelentferner ist nicht vermerkt. Betrachtet man zusätzlich den Wachstumsverlauf von H_2O_2 (Abb. 8) zeigt sich, dass selbst 12% stabilisierte H_2O_2 die Biomasseproduktion nach 6 Tagen nicht mehr negativ beeinflussen kann. Das Wachstumsniveau entspricht der, der unbehandelten Referenz mit dest. Wasser. Der Anstieg der Biomasse lässt sich womöglich auf das Vorhandensein der Fruchtsäure zurückführen. Die Proben wurden nach der Behandlung durch das Biozid direkt in trockene Petrischalen gelegt. Die Zellen konnten auf keine externen Nährstoffquellen zurückgreifen und es stand ihnen keine weitere Feuchtigkeit zur Verfügung. Da *Asp. versicolor* in der Lage ist

Carbonsäure-Derivate (u.a. L und D 2-Hydroxybutandisäure) [7] abzubauen, könnten Teile der im Jati-Schimmel-Entferner enthaltenen Carbonsäure-Derivate als C-Quellen gedient haben. Darüber hinaus ist hier noch mal hervorzuheben, dass die Carbonsäuren vergleichsweise hoch konzentriert sein müssen, um überhaupt eine hemmende Wirkung zu erreichen.

Biochemische Aktivität

Neben der Gesamtzellzahl wurden alle Proben bezüglich ihrer biochemischen Aktivität begutachtet. Die biochemische Aktivität der mit Ceresit-Anti-Schimmel (Abb. 12) behandelten Proben konnte über den gesamten Inkubationszeitraum des Versuchs nicht nachgewiesen werden. Selbst nach einem Monat konnte keine Aktivität festgestellt werden. Alle Werte waren < 1 . Mikroskopisch zeigte sich, dass die Zellen von einer Art „Schleimsack“ umgeben waren.

Auch die Behandlung mit 70%-igem IPA (Abb. 10) zeigt eine deutliche Reduktion der biochemischen Aktivität. Allerdings stieg die biochemische Aktivität nach 6 Tagen von $1,4 \cdot 10^5$ BA/cm² um rund das Vierfache auf $5,4 \cdot 10^5$ BA/cm² nach einem Monat und ist damit, nach den Bewertungskriterien der „Labor Urbanus GmbH“, immer noch als stark erhöht zu bewerten. Betrachtet man die Werte der Referenzprobe, die mit H₂O benetzt wurden, stellt man fest, dass die Aktivität nach 24 Stunden zwar um die Hälfte gefallen ist, aber sich die Zellen bereits nach 6 Tagen offensichtlich auf die neue Situation eingestellt und ihren Stoffwechsel wieder aufgenommen haben. Selbst nach weiteren 3 Wochen völlig ohne zusätzliche Flüssigkeit oder zusätzliche Nährstoffe ist hier rechnerisch der Rückgang der Aktivität nur 6 %.

Direkt nach 2 Stunden zeigt Jati-Schimmelentferner (Abb. 11) mit $6,3 \cdot 10^4$ BA/cm², nach Ceresit (Abb. 20) mit einem detektiertem Wert von < 1 BA/cm², die geringste BA, die bereits nach 24 wieder auf $5,4 \cdot 10^5$ BA/cm² stieg. Obwohl die Aktivität der mit Jati-Schimmelentferner behandelten Probe deutlich zurück geht, kann sie auch nach 6 Tagen und einem Monat noch nachgewiesen werden (Abb. 11). Bereits nach 2 Stunden überschreitet die BA/cm² den Normalwert, mit $6,3 \cdot 10^4$ BA/cm², um das 10²-fach und gilt damit nach den Bewertungskriterien der „Labor Urbanus GmbH“ als erhöht.

Vergleicht man die Verläufe der GZ (Abb. 8) und die der BA (Abb. 13) für H₂O₂ (12%) stellt man fest, dass H₂O₂ (12%) zum Zeitpunkt der Messung nach 2 Stunden und 24 Stunden keinen Zuwachs der Biomasse zeigten, obwohl sie in dieser Zeit eindeutig aktiver waren als nach 6 Tagen bzw. einem Monat, in der die Biomasse (Abb. 8) der mit H₂O₂ (12%) behandelten Probe eindeutig zugenommen hat. Die biochemische Aktivität wird mittels Fluoreszin, einem Fluoreszenzfarbstoff, nachgewiesen, der die Esterasenaktivität, die nur in intakten Zellen stattfindet, anzeigt. Allerdings regulieren manche Zellen ihren Stoffwechsel bei Substrat und Feuchtigkeitsentzug soweit zurück, dass es nicht mehr detektiert werden kann. Das heißt nicht, dass die Zellen abgestorben sind. Die Zellen sind in der Lage bei wiederkehrender Feuchtigkeit oder/und Substrat ihren Stoffwechsel wieder auf das ursprüngliche Niveau anzuheben. Damit verbunden ist auch die Fähigkeit wieder auf Nährböden anzuwachsen zu können. Insgesamt zeigt sich, dass alle Proben mit Ausnahme des Ceresit–Anti–Schimmel (hier konnte keine Aktivität gemessen werden) nach einem Monat einen Rückgang der Aktivität um mindestens 75% zeigten. Allerdings liegen die Werte entsprechend den „Labor Urbanus Bewertungskriterien“ immer noch mit dem 10³-fachen über dem Normalwert im stark erhöhten Bereich.

Koloniebildende Einheiten

Wie zu erwarten, sind die KBE/cm²-Werte aller 5 Chargen nach 24 Stunden rapide zurückgegangen (Abb. 14). Ohne Feuchtigkeit geht vielen Zellen die Fähigkeit verloren, direkt wieder auf Nährboden angezchtet zu werden. Ob Stücke eines Myzels oder Sporen angewachsen sind, kann bei dieser Methode (KBE-Bestimmung) nicht differenziert werden. Überraschenderweise konnten aber auch hier selbst nach einem Monat immer noch Zellen/Sporen als KBE nachgewiesen werden.

70%-iges IPA (Abb. 15) und Ceresit–Anti–Schimmel (Abb. 17) erreichten auch hier die größte Keimzahlreduktion. Einzig beim Ceresit–Anti–Schimmel (Abb. 17) konnte zu Beginn des Versuches, nach 2 und 24 Stunden, keine KBE/cm² mehr nachgewiesen werden. Die mit Ceresit–Anti–Schimmel (Hauptwirkstoff Natriumhypochlorid) behandelten Tapeten waren aufgrund der Oxidation durch den Wirkstoff NaOCl extrem porös und mussten vor der Überführung vorsichtig

zerteilt werden, um in ein Reagenzglas überführt werden zu können. Der typische Chlorgeruch war selbst nach einem Monat noch wahrzunehmen. Es zeigte sich aber, dass nach 6 Tagen wieder einige Zellen/Sporen angezüchtet werden konnten; $6,4 \cdot 10^1$ KBE/cm².

Bei den mit 70%-igem IPA behandelten Proben (Abb. 15) sank der Wert der nachweisbaren KBE/cm² kontinuierlich aber langsam. Nach einem Monat ohne Flüssigkeit veränderte sich der KBE/cm² vom Anfangswert $4,3 \cdot 10^4$ KBE/cm² auf $3,7 \cdot 10^2$ KBE/cm². Die Beobachtung der Wachstumsverläufe der beiden Wirkstoffe deutet darauf hin, dass die Behandlung durch die antimikrobiell wirkenden Stoffe nicht vollständig war und dass einige Zellen/Sporen offensichtlich gar nicht oder nicht ausreichend mit den Wirkstoffen in Kontakt kamen.

Bei Jati-Schimmelentferner (Abb. 16) konnten nach 6 Tagen, bis auf einen Ansatz mit einem KBE/cm²-Wert von $4,5 \cdot 10^1$, keine Zellen/Sporen mehr angezüchtet werden. Auch nach einem Monat ließen sich nur auf 3 Platten noch Kolonien anzüchten, die mit einem KBE/cm²-Wert von 8,6 aber keine Belastung darstellen vgl. Tab.1. Die Tatsache, dass die Zellen/Sporen trotz Mangel an Flüssigkeit und Nährstoffe, wieder auf einem Nährboden angezüchtet werden konnten, ist durchaus nennenswert.

Nach einem Monat konnten bei den mit 12%-igem H₂O₂ keine KBE mehr angezüchtet werden (Abb. 18). Allerdings gab es auch hier einen Ansatz, der mit einem Wert von $1,5 \cdot 10^1$ erfasst wurde. Die logarithmische Darstellung der KBE-Werte von H₂O₂ (Abb. 18) zeigt, dass die Werte kontinuierlich fallen.

Dass die KBE/cm²-Werte von Jati-Schimmelentferner (Abb. 16) bis 24 Stunden im Vergleich zu den anderen langsamer fallen, könnte wie bereits bei der GZ festgestellt dran liegen, dass eventuell noch länger eine Nahrungsquelle vorhanden war. Außerdem verdunstete die Flüssigkeit, die durch das Besprühen mit Jati-Schimmelentferner entstand, in den Proben erkennbar langsamer. Grundsätzlich zeigt sich aber, dass nach einem Monat kaum noch oder gar keine KBE mehr angezüchtet werden konnten. Tab.14 zeigt, dass bereits nach 6 Tagen alle Werte der behandelten Proben im Normalwertbereich (Tab. 1) lagen. Obwohl eindeutig, abgesehen von den mit Ceresit-Anti-Schimmel behandelten Proben, dessen biochemische Aktivität < 1 war, noch

biochemische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Ob sich bei der mit Wasserstoffperoxid behandelten Probe nach einem Monat noch ein Wachstum eingestellt hätte, wäre reine Spekulation. Die GZ- und BA-Werte allerdings zeigen eindeutig, dass die Zellen auch zu diesem Zeitpunkt noch aktiv waren.

Beim Vergleich der Gesamtgegeüberstellungen der Einzelnen antimikrobiell wirkenden Substanzen (Abb. 20 – Abb. 23), stellt man fest, dass sie im Hinblick auf eine Schadensbewertung (unter realen Bedingungen) widersprüchlich sind (wäre).

Betrachtet man den Wachstumsverlauf der Biomasse (GZ/cm²) (Abb. 20 – Abb. 23) einzeln ist der Befall eindeutig nachgewiesen und nicht behoben worden.

Betrachtet man den Wachstumsverlauf der Koloniebildenden Einheiten (KBE/cm²) (Abb. 20–Abb. 23) einzeln ist der Befall eindeutig nachgewiesen und behoben worden.

Bewertet man zusätzlich den Verlauf der biochemischen Aktivität (Abb. 20 – Abb. 23) über den gesamten Versuchszeitraum, stellt man fest, dass die Zellen (außer der Zellen die mit Ceresit–Anti–Schimmel behandelt wurden) über den gesamten Zeitraum aktiv waren, teilweise sogar stark erhöht.

6.1 Zusammenfassung der ermittelten Ergebnisse

Tab. 24 Zusammenfassung aller Messergebnisse: Startkultur enthielt $9,9 \cdot 10^8$ Zellen/cm²

	dest. H ₂ O				Isopropanol (70%)				Jati-Schimmelentferner				Ceresit-Anti-Schimmel				H ₂ O ₂ (12%)			
Zeit	2h	24h	6d	1M	2h	24h	6d	1M	2h	24h	6d	1M	2h	24h	6d	1M	2h	24h	6d	1M
GZ/cm ²	$9,8 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$	$9,7 \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$
BA/cm ²	$1,1 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$	$5,4 \cdot 10^5$	$6,3 \cdot 10^4$	$5 \downarrow, 4 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	< 1	< 1	< 1	< 1	$1,8 \cdot 10^6$	$9,2 \cdot 10^5$	$8,3 \cdot 10^4$	$5,7 \cdot 10^5$
KBE/cm ²	$1,5 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^6$	$6,3 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^3$	$7,9 \cdot 10^2$	$3,7 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^7$	< 1	8,6	< 1	< 1	$6,4 \cdot 10^1$	$4,3 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^8$	$8,9 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^2$	< 1

Tab. 25 Tabellarische Übersicht über GZ/cm², BA/cm² und KBE/cm² über den Zeitraum des Versuchs

Bezeichnung	dest. H ₂ O				Isopropanol (70%)				Jati-Schimmelentferner				Ceresit-Anti-Schimmel				H ₂ O ₂ (12%)			
	2h	24h	6d	1M	2h	24h	1W	1M	2h	24h	1W	1M	2h	24h	1W	1M	2h	24h	1W	1M
GZ/cm ²	•↓	↑	↔↑	↑	•↓	↔↑	↑	↓	•↓	↑	↑	↑	•↓	↑	↑	↑	•↓	↔↓	↑	↑
BA/cm ²	•↓	↓	↑	↔↓	•↓	↑	↓	↑	•↓	↑	↓	↔↓	•X	X	X	X	•↓	↓	↓	↑
KBE/cm ²	•↓	↑	↓	↓	•↓	↓	↔↓	↔↓	•↓	↓	X	↑	•X	X	↑	↔↓	•↓	↓	↓	X

• = Erster Messwert;

↑ = Wert im Vergleich zum vorherigen Wert gestiegen;

↓ = Wert im Vergleich zum vorherigen Wert gefallen;

↔ = Wert im Vergleich zum vorherigen Wert gestiegen nahezu gleich geblieben

7 Ausblick

Laut dem Umweltbundesamt können bei Schimmelpilzbefall je nach Material kleinere, mit Schimmelpilzen befallene Flächen zunächst selbstständig gereinigt werden, wenn diese $0,5 \text{ m}^2$ nicht übersteigen und nicht tiefergehend sind [6]. Ob ein Schaden wirklich tiefergehend ist oder nicht, können ohne Hilfsmittel selbst Fachleute nur vermuten. Für einen Laien ist das Bewerten eines Schadens kaum möglich. Außerdem werden Schimmelpilze erst sichtbar, wenn es bereits zu einer Sporulation gekommen ist und er durch die Färbung der Fruchtkörper sichtbar wird. Das wachsende Myzel ist an der Wand oder anderen Materialien für das menschliche Auge nicht wahrnehmbar. Mit *Asp. versicolor* wurde für diesen Versuch nicht nur ein sehr häufiger vorkommender, sondern auch Toxin produzierender Organismus gewählt. Die Ergebnisse des Versuchs zeigen deutlich, dass keines der verwendeten Desinfektionsmittel die Zunahme der Biomasse auf der Tapete dauerhaft verhindern konnte. Der gemittelte Anfangswert lag bei $8,8 \cdot 10^6$ pro cm^2 Zellen. Er konnte zu keiner Zeit auf einen tolerierbaren Biomassen-Normalwert reduziert werden. Selbst H_2O_2 (12%), das bis 24 Stunden vergleichsweise am besten wirkte, lag mit $9,8 \cdot 10^6 \text{ GZ/cm}^2$ immer noch im stark erhöhten Bereich. Nach 6 Tagen zeigten alle behandelten Chargen sogar einen etwas größeren Anstieg der Biomasse als die völlig unbehandelte Probe. Besonders auffällig war dies bei der mit Jati-Schimmelentferner behandelten Probe. Es schien das Wachstum sogar zu fördern. Die Bedingungen waren für *Aspergillus versicolor* ohne Substrat und Flüssigkeit denkbar schlecht. Trotzdem konnten sie selbst nach einem Monat noch angezchtet werden. Mit einem a_w -Wert von 0,78 ist *Asp. versicolor* ein xerophiler Organismus, der äußerst tolerant für weite pH-Wert Bereiche ist und auch kurzfristig alkalische Bedingungen gut verträgt [3], [7]. Die Ergebnisse und Erkenntnisse aus dem vorangegangenen Versuch von 2010 werden untermauert. Desinfektionsmittel eignen sich nicht zur Dekontaminierung von stark kontaminierten Innenraum Baumaterialien, hier Tapete. Auch scheint die oft verwendete Applikationsmethode den antimikrobiellen Wirkstoff durch

Besprühen aufzutragen, nicht geeignet zu sein. Außerdem können Sporen durch einen zu hohen Aerosoldruck von der Befallenen Stelle gelöst werden und so andere Stellen des Wohnraums befallen. Die Behandlung ist nur oberflächlich und entsprechend der physikalisch chemischen Eigenschaften von 70%-igen IAP, 12%-igen H_2O_2 oder NaOCl verflüchtigen sich die Wirkstoffe zu schnell. Bei den Wirkstoffen H_2O_2 und NaOCl kommen zusätzlich noch die oxidativen Eigenschaften und der „Medieneffekt“ (Eiweißeffekt) zutragen. Aufgrund der gesundheitsschädlichen Eigenschaften von beispielsweise Chlor ist es durchaus bedenklich, dass sich ein Teil der Stoffe offensichtlich verflüchtigt, also auch eingeatmet werden kann. Diese Substanzen können nur in Räumen mit Lüftungsmöglichkeit benutzt werden. Die Vermutung liegt nahe, dass der Grad der Reduktion von Biomasse noch schlechter bei der Verwendung von poröserem Material gewesen wäre. Zellen, die sich weiter innen im befallenen Material befinden, kommen dann evtl. nicht mit dem Wirkstoff in Kontakt. Sobald Substrat und/oder Flüssigkeit wieder verfügbar werden, würden sich die Zellen erholen.

Ein Muster, das aus der Praxis wohl bekannt ist. Nach der Behandlung des Befalls mit einem Desinfektionsmittel oder Fungizid, tritt der Schaden nach einer gewissen Zeit „wieder“ auf. Betrachtet man die Ergebnisse des Modellversuchs im Hinblick auf diese Problematik, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der Befall offensichtlich nie behoben war. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass selbst von den antimikrobiell behandelten, abgestorbenen Zellen noch toxische Stoffe ausgehen können. Schlussendlich kann ein Befall nur dadurch behoben werden, indem er vollständig entfernt und die Ursache, die zum Befall geführt hat, abgestellt wird.

Weiterführende Versuche könnten es zum Ziel haben, zunächst andere kontaminierte Baumaterialien (u.a. porösere) nach vorangegangenen Dekontaminierungsmaßnahmen bezüglich der GZ, BA und KBE zu testen. Im Weiteren sollten hier die Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe variiert werden. Da bei einem Befall praktisch keine Reinkulturen vorkommen, sollten Versuche mit Mischkulturen durchgeführt werden. Außerdem sollten Alternativen zur Applikationsmethode des Aufsprühens gesucht werden.

8 Literaturverzeichnis

- [1] 6th International Scientific Conference on Bioaerosols, Fungi, Bacteria, Mycotoxins in Indoor and Outdoor Environments and Human Health. Investigation of effectiveness of mold detergents and chemicals on total cell numbers of mold on building materials, September 6 - 9, 2011 Saratoga Springs, New York, USA Urban Palmgren, PhD, Labor Urbanus GmbH, Düsseldorf, Germany
- [2] Kück Ulrich Nowrousian Minou, Hoff Birgit, Engh Ines, Reiß Jürgen (2009) Schimmelpilze. Lebensweise, Nutzen, Schäden, Bekämpfung. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- [3] Hankammer Gunter / Lorenz Wolfgang (2003) Schimmelpilze und Bakterien in Gebäuden. Erkennen und Beurteilen von Symptomen und Ursachen. Verlagsgesellschaft Rudolf Müller GmbH & Co. KG, Köln
- [4] Umweltbundesamt Innenraumlufthygiene-Kommission (2002) Leitfaden zur Vorbeugung, Untersuchung, Bewertung und Sanierung von Schimmelpilzwachstum in Innenräumen (Schimmelpilz-Leitfaden). Umweltbundesamt Berlin
- [5] Landes Gesundheits Amt Baden-Württemberg (2004) Schimmelpilze in Innenräume – Nachweis, Bewertung, Qualitätsmanagement. Landes Gesundheits Amt Baden-Württemberg
- [6] Umweltbundesamt Innenraumlufthygiene-Kommission (2005) Leitfaden zur ursachensuche und Sanierung bei Schimmelpilzwachstum in Innenräumen („Schimmelpilzsanierungs-Leitfaden“).
- [7] <http://mycota-crcrcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=98#ancre11>, (18.04.2012)
- [8] Urban Palmgren (2004) Gesamtzellzahl, KBE und biochemische Aktivität von Bakterien und Schimmelpilzen in Baumaterialen. Welche zusätzlichen Kenntnisse liefert die Beurteilung einer erweiterten mikrobiologischen Analyse? Schriftreihe des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck Band 8
- [9] Landes Gesundheits Amt Baden-Württemberg (2006) Handlungsempfehlungen für die Sanierung von mit Schimmelpilzen befallenen Innenräumen. Landes Gesundheits Amt Baden-Württemberg
- [10] Umwelt Bundes Amt Presseinformation Nr. 26/(2009) Schimmelbefall in der Wohnung. Umweltbundesamt empfiehlt: fachgerecht sanieren ohne Desinfektionsmittel
- [11] Bast Eckhard (2001) Mikrobiologische Methoden. Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin
- [12] Kunz Peter / Frietsch Günter (1986) Mirobizide Stoffe in biologischen Kläranlagen. Immissionen und Prozeßstabilität. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo
- [13] Meier Christina (2006) Schimmelpilze auf Papier. Fungizide Wirkung von Isopropanol und Ethanol. Papier Restaurierung Vol. 7 2006, No.1
- [14] <http://www.jatiproducts.de/fruchtsaeuren.html> (30.4.2012)
- [15] <http://www.jatiproducts.de/tm-spe.html> (30.4.2012)